



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**GERMANA SILVA VASCONCELOS**

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TIPO 1 DA ANGIOTENSINA II (AT1R) EM  
MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DOIS DESAFIOS:  
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E EFEITO PREVENTIVO DA  
CANDESARTANA**

**FORTALEZA**

**2019**

**GERMANA SILVA VASCONCELOS**

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TIPO 1 DA ANGIOTENSINA II (AT1R) EM  
MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DOIS DESAFIOS:  
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E EFEITO PREVENTIVO DA  
CANDESARTANA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos

**FORTALEZA**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S58e Silva Vasconcelos, Germana.  
ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TIPO 1 DA ANGIOTENSINA II (AT1R) EM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DOIS DESAFIOS: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E EFEITO PREVENTIVO DA CANDESARTANA / Germana Silva Vasconcelos. – 2019.  
95 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos.
1. Esquizofrenia. 2. Candesartana. 3. Receptor AT1. 4. diferença de sexo. 5. poly(I:C). I. Título.  
CDD 615.1
-

**GERMANA SILVA VASCONCELOS**

**ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TIPO 1 DA ANGIOTENSINA II (AT1R) EM  
MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DOIS DESAFIOS:  
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E EFEITO PREVENTIVO DA  
CANDESARTANA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Aline Santos Monte  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB)

---

Profa. Dra. Vanessa Costhek Abílio  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

---

Profa. Dra. Júlia Ariana de Souza Gomes  
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

---

Profa. Dra. Alyne Mara Rodrigues de Carvalho (Suplente)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior (Suplente)  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

“No meio da confusão, encontre a simplicidade.  
A partir da discórdia, encontre a harmonia. No  
meio da dificuldade reside a oportunidade.”  
(Albert Einstein)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado saúde e determinação para chegar até aqui.

Aos meus pais, Nonato e Ofélia, por todo apoio, incentivo e dedicação, tornando os meus sonhos em seus sonhos. Em especial, dedico esse momento ao meu pai, que tanto desejou e torceu para chamar a filha de doutora.

Ao meu marido, Abelardo, por ser minha fonte de inspiração, por acreditar na minha capacidade e por me acolher prontamente nos momentos de ansiedade e angústia. Obrigada pelas palavras de incentivo, amizade e apoio nesse ciclo de aprendizado.

À minha irmã Juju, pelos momentos de descontração que eu tanto precisei e por sempre me mostrar um caminho divertido de ver alguns desafios.

À minha orientadora, Professora Silvânia, por sempre acreditar que somos capazes de ultrapassar os nossos limites. Ao longo de todos esses anos e não foram poucos, criamos um laço muito forte, uma mãe científica a quem devo muita gratidão para o resto da vida.

À minha co-orientadora, Professora Daniele, por ser uma fonte de conhecimento e inspiração científica.

Aos meus amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, em especial Ingridy, Manuel, Naiara, Caren, Aline, Camila, Eliclécio, Greicy, Tati, Charli, Taci, Giovanna, por toda ajuda, por terem feito essa jornada muito mais prazerosa e feliz. Mais uma vez tenho que ressaltar que seria impossível sem vocês.

À Vilanir, pelo companheirismo desde a época da iniciação científica, monografia, mestrado e doutorado.

À banca examinadora, pela disponibilidade e por todas as contribuições e correções acerca deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

### ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TIPO 1 DA ANGIOTENSINA II (AT1R) EM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DOIS DESAFIOS: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E EFEITO PREVENTIVO DA CANDESARTANA

A esquizofrenia é um transtorno mental grave e crônico que acomete mais de 21 milhões de pessoas no mundo. Os principais sintomas são: positivos (alucinações, delírios e paranoia), negativos (isolamento social, anedonia e alogia) e cognitivos (déficits na memória de trabalho e na atenção). Há importante influência do sexo quanto ao início dos sintomas, à gravidade dos sintomas e à resposta aos antipsicóticos, com as mulheres tendo, em geral, um melhor curso da doença do que os homens, provavelmente pelo efeito protetor que o estrógeno exerce. A hipótese neurodesenvolvimental que dá suporte a fisiopatologia da esquizofrenia vem ganhando destaque. Baseado nela foi desenvolvido um modelo animal de esquizofrenia induzido por “dois desafios”, sendo o primeiro “desafio” uma ativação imune na fase neonatal e o segundo “desafio” composto por eventos estressores na peripuberdade. A Candesartana (CAND), um fármaco bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II (BRA) com diferentes propriedades neuroprotetoras, tornou-se nosso alvo na perspectiva da prevenção de alguns dos déficits neuropatológicos característicos da esquizofrenia. Dessa forma, nosso estudo avaliou se o tratamento preventivo com a CAND 0,3mg/kg v.o. na puberdade (dia pós-natal (DPN) 30 a 50) foi capaz de prevenir os sintomas comportamentais e neuroquímicos do tipo esquizofrenia em camundongos swiss machos e fêmeas que sofreram ativação imune neonatal (DPN5-7) induzida pela partícula viral poly(I:C) e passaram por eventos estressores durante a puberdade (DPN35-43), evidenciando as possíveis diferenças de sexo encontradas. Analisamos os sintomas tipo positivos (testes de Inibição pré-pulso e Atividade locomotora), negativos (teste da Interação social) e cognitivos (teste do Labirinto em Y). Além disso, analisamos a expressão protéica do receptor AT1 e fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), o estresse oxidativo (peroxidação lipídica e nitrito) e citocinas inflamatórias (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL4). Os resultados mostraram que o modelo de dois desafios induziu comportamento tipo-esquizofrenia em ambos os sexos com déficits de IPP e hiperlocomoção (sintomas positivos), prejuízo social (sintomas negativos) e déficits na memória de trabalho (sintomas cognitivos). Sendo a CAND capaz de prevenir todas as alterações comportamentais. Além disso, foi revelado uma supra expressão dos receptores AT1 e do NF- $\kappa$ B nos animais machos submetidos aos dois desafios, sendo a CAND capaz de prevenir esse aumento neste sexo. Ademais, a CAND foi capaz de prevenir o aumento da peroxidação lipídica no hipocampo (nos machos) e no plasma (ambos os sexos); e o aumento nos níveis de nitrito no hipocampo (apenas nas fêmeas) e no plasma (ambos os sexos) nos animais submetidos ao modelo de dois desafios. Quanto aos níveis das citocinas IL1 $\beta$ , IL4 e TNF $\alpha$  no hipocampo, apenas os animais machos submetidos ao modelo apresentaram níveis elevados, sendo a CAND eficiente em prevenir essa elevação. Nossos resultados apontam para uma interação entre desafio imune neonatal e eventos estressores na adolescência contribuindo para o desenvolvimento de alterações comportamentais e neuroquímicas tipo esquizofrenia na idade adulta em animais machos e fêmeas, os quais podem ser prevenidos, em parte, pelo tratamento com a CAND. Desta forma, sugerimos que o uso de BRAs pode ser uma alternativa interessante para a condução de pesquisas com modelos animais com validade translacional em psiquiatria.

**Palavras-chaves:** Esquizofrenia, Candesartana, Receptor AT1, diferença de sexo, poly(I:C).

## ABSTRACT

### INVOLVEMENT OF ANGIOTENSIN II (AT1R) TYPE 1 RECEPTORS IN TWO HIT ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA: SEX INFLUENCE STUDY AND CANDESARTAN PREVENTIVE EFFECT

Schizophrenia is a serious and chronic mental disorder that affects more than 21 million people in the world. The main symptoms are: positive (hallucinations, delusions and paranoia), negative (social isolation, anhedonia and alogia) and cognitive (deficits in working memory and attention). There is a significant influence of sex on the prognosis of this disease, severity of symptoms and response to antipsychotics, with women generally having a better course of the disease than men, probably because of the protective effect of estrogen. The neurodevelopmental hypothesis that supports the pathophysiology of schizophrenia has been highlighted. Based on this, an animal model of schizophrenia induced by "two hits" was developed, the first "challenge" being an immune activation in the neonatal phase and the second "hit" composed of stress events in peripuberty. Candesartan (CAND), an angiotensin II receptor blocker (ARB) with different neuroprotective properties, has become our target in the perspective of preventing some of the neuropathological deficits characteristic of schizophrenia. Thus, our study evaluated whether preventive treatment with CAND 0.3mg / kg p.o. at puberty (postnatal day (PND) 30 to 50) was able to prevent behavioral and neurochemical symptoms of the schizophrenia type in male and female swiss mice who underwent neonatal immune activation (PND 5-7) induced by the poly (I: C) viral particle and underwent stressful events during puberty (PND35-43), evidencing the possible sex differences found. We analyzed positive type symptoms (pre-pulse Inhibition and Locomotor Activity tests), negative (Social Interaction test) and cognitive (Y-Maze test). In addition, we analyzed the AT1 receptor protein expression and nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B), oxidative stress (nitrite and lipid peroxidation), and inflammatory cytokines (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL4). The results showed that the two-hit model induced type-schizophrenia behavior in both sexes with deficits of IPP and hyperlocomotion (positive symptoms), social impairment (negative symptoms) and deficits in working memory (cognitive symptoms). In addition, a supra expression of AT1 and NF- $\kappa$ B receptors was shown in male animals submitted to both challenges, and CAND was able to prevent this increase in this sex. In addition, CAND was able to prevent the increase in lipid peroxidation in the hippocampus (males) and plasma (both sexes), and the increase in nitrite levels in the hippocampus (females only) and plasma (both sexes) in the animals submitted to the two challenges model. As for cytokines IL1 $\beta$ , IL4 and TNF $\alpha$  in the hippocampus, only male animals submitted to the model presented high levels, and CAND was efficient in preventing this choice. Our results point to an interaction between neonatal immune challenge and stressful events in adolescence, contributing to the development of behavioral and neurochemical changes such as schizophrenia in adulthood, which can be prevented in part by treatment with CAND. In this way, we suggest that the use of BRAs may be an interesting alternative for conducting research with animal models with translational validity in psychiatry.

**Keywords:** Schizophrenia, Candesartan, AT1 Receptor, sex difference, poly(I:C).



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Divisão dos grupos experimentais

37

## LISTA DE FIGURAS

Fig.1	As vias dopaminérgicas da esquizofrenia	17
Fig.2	Protocolo experimental	36
Fig.3	Inibição pré-pulso (IPP)	39
Fig.4	Representação real do aparelho para teste de inibição pré-pulso	40
Fig.5	Avaliação da Atividade Locomotora através do software SMART	42
Fig.6	Protótipo e aparato utilizado para o teste de Interação Social	43
Fig.7	Teste do Labirinto em Y	44
Fig.8	Efeito da CAND na média da % de IPP (poly(I:C) + E+) de camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios	49
Fig.9	Efeito da CAND no número total de cruzamentos percorridos pelos animais machos e fêmeas submetidos ao modelo de “dois desafios” (poly(I:C) + E+) e suas respectivas trajetórias representativas.	51
Fig.10	Efeito da CAND na Interação social e na % de Alterações corretas em camundongos submetidos ao modelo de dois desafios (poly(I:C) + E+) machos e fêmeas.	53
Fig.11	Efeito da CAND na expressão proteica de AT1 e NF- $\kappa$ B avaliada no hipocampo de camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios (poly(I:C) + E+).	55
Fig.12	Efeito da CAND nos níveis hipocampais de IL1 $\alpha$ , IL4 e TNF $\alpha$ em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios (poly(I:C) + E+).	57
Fig.13	Efeito da CAND nos níveis hipocampais de TBARS e Conteúdo de nitrito em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios (poly(I:C) + E+).	59
Fig.14	Efeito da CAND nos níveis plasmáticos de TBARS e Conteúdo de nitrito em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios (poly(I:C) + E+).	61
Fig.15	Esquema representativo das vias de sinalização da angiotensina II	72

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANGII	Angiotensina II
AT1R	Receptor de angiotensina tipo 1
ATP	Adenosina Trifosfato
ATV	Área tegumentar ventral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BRAs	Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina
CAND	Candesartana
CPF DL	Córtex pré-frontal dorso-lateral
CPF VM	Córtex pré-frontal ventro-medial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPN	Dia Pos-Natal
E <sup>+</sup>	Exposto ao estresse
E <sup>-</sup>	Não exposto ao estresse
DSM-5	Manual diagnóstico e estatístico de distúrbios mentais
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and drug administration
GSH	Glutathiona reduzida
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IL-1RA	Receptor de il-1 antagonista
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
I.P	Intraperitoneal
IPP	Inibição pré-pulso
LPS	Lipopolissacarideo
MDA	Malondialdeído
NF-kB	Fator kappa nuclear

NMDA	N-metil-d-aspartato
NMDA-R	Receptor n-metil-d-aspartato
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
Poly (I:C)	Partícula viral mimética polyinosinic:polycytidylic acid
RNA	Ácido ribonucleico
sIL-2R	Receptor solúvel de il-2
SNC	Sistema nervoso central
SNc	Substância nigra pars compacta
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina-angiotensina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
V.O.	Via Oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Aspectos gerais da esquizofrenia .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2. Fisiopatologia .....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Hipótese dopaminérgica .....	17
1.2.3. Hipótese neuroinflamatória .....	20
1.2.4. Hipótese neurodesenvolvimental.....	22
1.2.5. Estresse oxidativo e esquizofrenia.....	23
<b>1.3. A importância do pródromo na esquizofrenia .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4. Modelo animal de “dois desafios” .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5. Tratamento farmacológico da esquizofrenia .....</b>	<b>27</b>
<b>1.6. Candesartana .....</b>	<b>29</b>
<b>1.7. Influência do gênero na esquizofrenia.....</b>	<b>31</b>
<b>2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Animais.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. Drogas.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3. Protocolo Experimental .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Estímulos estressores (GIOVANOLI et al., 2013b).....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Determinações comportamentais.....</b>	<b>40</b>
4.5.1 Inibição Pré-pulso (IPP) .....	40
4.5.2 Campo Aberto.....	42
4.5.3 Interação Social .....	43
4.5.4 Labirinto em Y.....	44
<b>4.6 Determinações biomoleculares e neuroquímicas.....</b>	<b>45</b>
4.6.1 Expressão proteica de AT1R e NFκB .....	45
<b>4.6.1.1 Extração de proteínas .....</b>	<b>45</b>
<b>4.6.1.2 Método Bradford para dosagem de proteínas .....</b>	<b>45</b>
<b>4.6.1.3 Western Blotting.....</b>	<b>46</b>
4.6.2 Determinações inflamatórias (IL4, IL1β e TNFα) .....	47
4.6.3 Determinações do estresse oxidativo.....	47
<b>4.6.3.1 Peroxidação lipídica .....</b>	<b>47</b>
<b>4.6.3.2 Nitrito.....</b>	<b>47</b>
<b>4.7 Análise estatística .....</b>	<b>48</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Resultados das alterações comportamentais.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Resultados da avaliação da expressão proteica do receptor AT1.....</b>	<b>55</b>

<b>5.4</b>	<b>Resultado das alterações nos níveis de citocinas no hipocampo .....</b>	<b>57</b>
<b>5.5</b>	<b>Resultados das alterações oxidativas e nitrosativas.....</b>	<b>58</b>
5.5.1	Alterações na região cerebral do hipocampo .....	58
5.5.2	Alterações no compartimento plasmático .....	61
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da esquizofrenia

O termo clínico esquizofrenia é de origem relativamente recente em comparação com outros transtornos (JABLENSKY, 2010). Na antiguidade, a medicina era fortemente misturada com misticismo e as doenças mentais eram atribuídas a fenômenos paranormais, como a possessão por espíritos (KYZIRIDIS, 2005). Essa visão seguiu pela idade média, onde embora avanços fossem feitos, como a criação do primeiro asilo na Europa, a população ainda explicava sintomas como alucinações e delírios através da religião, acreditando que demônios estariam causando tais enfermidades (BRIGGS, 2002).

Pela metade do século 19, com a sociedade europeia profundamente modificada pela revolução científica e industrial, psiquiatras europeus começaram a descrever casos de insanidade tipicamente afetando jovens, casos esses que muitas vezes levavam a uma deterioração cognitiva e comportamental crônica. Emil Kraepelin, um psiquiatra alemão, uniu todos esses diversos casos em uma única condição que chamou de “Demência Precoce”(FUSAR-POLI; POLITI, 2008).

Posteriormente, um psiquiatra suíço, Eugen Bleuler, desafiou o conceito original da “Demência Precoce”, argumentando que a mesma é baseada em um estágio terminal de demência e falha, assim, por excluir casos clínicos que não chegassem a evoluir para um estado terminal de deterioração (JABLENSKY, 2010). Bleuler é o responsável por cunhar o termo “esquizofrenia”, que, do grego, significa “mente dividida”, em pacientes que apresentavam uma desconexão entre os processos de pensamentos e respostas emotivas (SILVEIRA, 2009). Em síntese, a história da esquizofrenia vai de possessão demoníaca a doença identificável, e de exorcismos aos antipsicóticos (OWEN, 2014).

Atualmente, a esquizofrenia é conhecida por ser um distúrbio mental grave e crônico, que acomete mais de 21 milhões de pessoas ao redor do mundo provocando mudanças na percepção, pensamentos e comportamentos (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2016). A expectativa de vida para essas pessoas é menor que para a população em geral, de 11 a 20 anos de vida a menos que a população normal (LAURSEN et al., 2013), sendo o suicídio um importante fator, uma vez que 10% dos indivíduos com esquizofrenia o cometem em virtude da qualidade insuportável dos sintomas. É um distúrbio tratável, no entanto cerca de uma em cada duas pessoas com esquizofrenia não recebe tratamento adequado para a doença.(LAURSEN et al., 2013; TERMORSHUIZEN et al., 2012; “WHO | Schizophrenia”, 2016).

Os sintomas que caracterizam a esquizofrenia podem ser divididos em categorias como “positivos”, “negativos” e “cognitivos” (HARVEY et al., 1996; LARSON; WALKER; COMPTON, 2010). As anormalidades do período psicótico são chamadas sintomas positivos porque refletem a presença de comportamentos anormais como delírios, paranoia, alucinações visuais e auditivas, pensamentos desorganizados e incoerentes e perda da associação normal entre as ideias. Já os sintomas do período não psicótico são chamados de sintomas negativos e são caracterizados pela síndrome amotivacional, os quais são mais difíceis de tratar, como, retraimento social, apatia, anedonia e alogia. Enquanto os sintomas cognitivos da esquizofrenia envolvem distúrbios nas funções executivas, como perda de memória, incapacidade de manter a atenção e falta de percepção, ou seja, um vasto conjunto de disfunções cognitivas (MEYER; FELDON, 2010; KAHN et al., 2015). Os sintomas negativos e cognitivos tem uma duração geralmente crônica, enquanto os sintomas positivos surgem de tempos em tempos, portanto de maneira episódica (WEICKERT et al., 2000).

O diagnóstico da esquizofrenia é feito utilizando os critérios estabelecidos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais (DSM-5). Os critérios do DSM-5 requerem apenas dois ou mais sintomas e pelo menos um deles deve ser (1), (2) ou (3): 1. Delírios. 2. Alucinações, 3. Discurso desorganizado, 4. Comportamento grosseiramente desorganizado ou catatônico e 5. Sintomas negativos (i.e., reduções proeminentes na expressão da emoção e avolia) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Além disso, cerca de oitenta a noventa por cento dos pacientes com esquizofrenia relatam uma gama de sintomas, que incluem mudanças nas percepções, crenças, cognição, humor e comportamento, antes de ficarem psicóticos. São os chamados sinais prodrômicos da doença. Os demais 10 a 20 % desenvolvem quadros psicóticos agudos, sem sinais prodrômicos (GOURZIS; KATRIVANOU; BERATIS, 2002).

Geralmente a incidência da esquizofrenia tem um pico no período da adolescência e no início da idade adulta, no entanto esse período pode variar com o sexo, que aparentemente modifica a relação idade-incidência. As observações sugerem que o início do distúrbio é mais precoce para homens, apresentando um pico acentuado no final da adolescência (entre 18 e 25 anos) com as taxas permanecendo relativamente constantes, enquanto nas mulheres o pico inicial é mais tardio (25 a 35 anos) e o segundo pico entre 55 e 64 anos (PEDERSEN et al., 2014; SADOCK, 2016; VAN DER WERF et al., 2014).

Visto isso, o reconhecimento de que a psicose evidente não é o começo e nem a característica central da esquizofrenia (SOMMER et al., 2016), as perspectivas atuais visam promover uma melhoria na terapêutica da esquizofrenia através do reconhecimento dos sinais



e sintomas precoces e da prevenção em indivíduos com alto risco para desenvolver a doença (GAEBEL, 2011).

## 1.2.Fisiopatologia

A compreensão da fisiopatologia da esquizofrenia avançou no último século, evoluindo de teoria etiológica unicausal para modelos mais complexos (ARARIPE NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007). Ou seja, a disfunção da neurotransmissão dopaminérgica contribui na gênese dos sintomas psicóticos, mas as evidências também apontam para um envolvimento mais amplo e variável de áreas e circuitos cerebrais (OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016). Visto isso, podemos elucidar que a esquizofrenia está relacionada, mas não limitada a: i) disfunção na sinalização dos neurotransmissores, tais como dopaminérgicos e glutamatérgicos (BUCKLEY; STAHL, 2007); ii) desequilíbrio oxidativo/nitrosativo (ZHANG et al., 2010a) e um constituinte comum entre estas hipóteses pode ser um sistema imunológico disfuncional (GIBNEY; DREXHAGE, 2013).

### 1.2.1. Hipótese dopaminérgica

As hipóteses dos neurotransmissores são as hipóteses, ainda hoje, mais importantes na esquizofrenia. Elas são postuladas principalmente sobre disfunções da dopamina (monoamina) e do glutamato (aminoácido), porém não excluindo a participação de outros neurotransmissores por vias coparticipavas (GAEBEL, 2011a; HOWES et al., 2013; SELVARAJ et al., 2014).

A hipótese dopaminérgica da esquizofrenia foi proposta inicialmente em 1960 quando o primeiro antipsicótico, clorpromazina, tratou com sucesso os sintomas positivos de pacientes esquizofrênicos (KIM; NA, 2017). A hipótese da hiperatividade dopaminérgica tem como suporte o tratamento bem-sucedido dos sintomas psicóticos por agentes bloqueadores dos receptores do tipo D2 no sistema mesolímbico (KAPUR; SEEMAN, 2001). Além disso, drogas que aumentam a atividade dopaminérgica no sistema nervoso central (SNC), como após intoxicação com estimulantes como anfetamina pode causar sintomas psicóticos que se assemelham à esquizofrenia (TSOI et al., 2008; ANGRIST; KAMMEN, 1984).

A neurotransmissão dopaminérgica no Sistema Nervoso Central é mediada por quatro principais vias (Fig. 1), que são: (a) a via mesocortical que tem projeções da ATV para o córtex pré-frontal; (b) A via nigroestriatal, com os corpos celulares na substância nigra *pars compacta* (SNc) e as projeções dopaminérgicas vão para o estriado dorsal; (c) a via tuberoinfundibular, cujas fibras nervosas se projetam do hipotálamo para a hipófise anterior e (d) a via mesolímbica,

com fibras que se projetam da área tegumentar ventral (ATV) para o estriado ventral, o que inclui o núcleo accumbens, o núcleo caudado e estruturas do sistema límbico como o hipocampo e a amígdala (LUO; HUANG, 2016; SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007; STAHL, 2013).

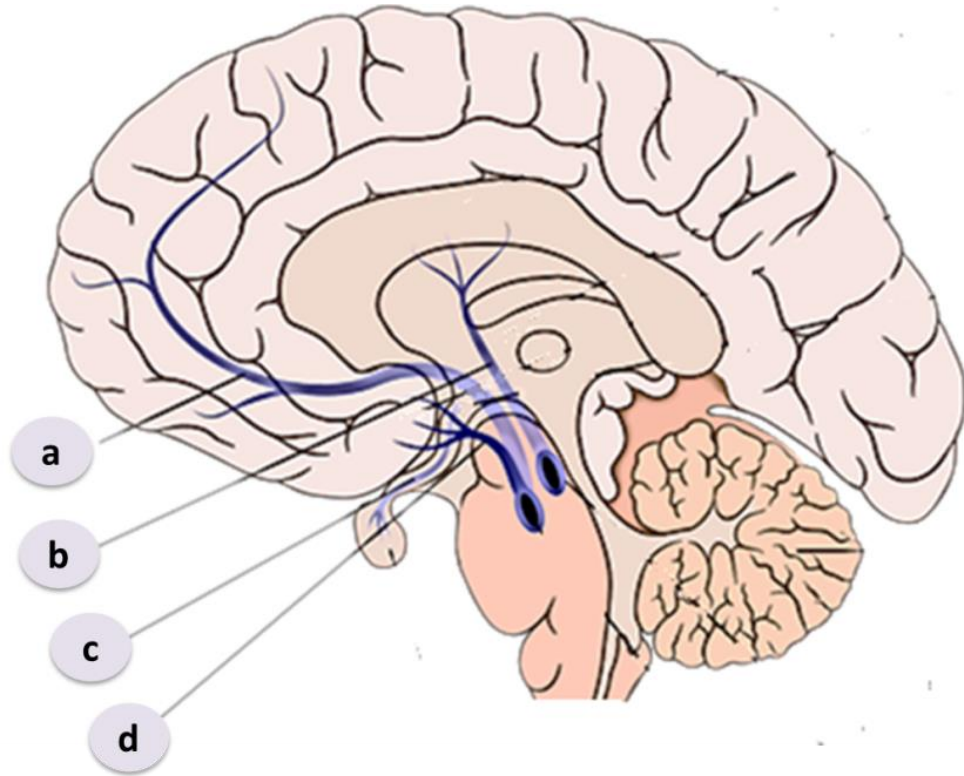


Fig. 1: As vias dopaminérgicas da esquizofrenia. a) via mesocortical, b) via nigroestriatal, c) via tuberoinfundibular, d) via mesolímbica. (Fonte: Do próprio autor)

As vias mesolímbica e mesocortical estão criticamente relacionadas com o processamento e regulação de estímulos emocionais e à flexibilidade comportamental (KRINGELBACH; BERRIDGE, 2009). No indivíduo esquizofrênico, a hiperatividade da neurotransmissão dopaminérgica mesolímbica promove um aumento da liberação de DA, responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia (ARICIOGLU et al., 2016). Enquanto isso, os sintomas negativos e déficit cognitivo estão associados com a hipoatividade da transmissão mesocortical que afeta tanto o córtex pré-frontal dorsolateral, provocando uma insuficiente estimulação de receptores D1, quanto o córtex pré-frontal ventromedial, responsável pelos sintomas negativos e afetivos associados à esquizofrenia (STAHL, 2013).

Entretanto, foi visto que este sistema não poderia explicar todo o espectro da esquizofrenia, pois apesar de o aumento nos níveis de dopamina estar relacionado à fisiopatologia da esquizofrenia e ser efetivo para o tratamento dos sintomas positivos, o uso

crônico de antagonistas dopaminérgicos tem poucos efeitos sobre os sintomas negativos e cognitivos e afetivos (que poderiam inclusive ser piorados por estas medicações em algumas situações) (MELTZER et al., 2003; MEYER, 2007; NIKAM; AWASTHI, 2008; GAEBEL, 2011; LONDERO; MASSUDA; GAMA, 2015).

Outra restrição, sugerida por Laruelle et al., (1999), mostra que durante episódios agudos o sistema dopaminérgico de pacientes permanecia em estado ativado, mas não em períodos de remissão. Tal fato provavelmente ocorra devido o sistema dopaminérgico de esquizofrênicos ser hiperresponsivo, porém, como sugere o estudo de Abi-Dargham e Moore, 2003 esta hiperresponsividade é transitória já que nas fases de remissão dos sintomas psicóticos o sistema dopaminérgico se comporta como o dos voluntários sadios.

Assim, embora a hiperatividade na função dopaminérgica subcortical contribua substancialmente para a manifestação dos sintomas positivos, a hipótese original da dopamina deve ser estendida para incluir contribuições de outros sistemas de neurotransmissores na fisiopatologia da esquizofrenia (GRÜNDER; CUMMING, 2016).

### 1.2.2. Hipótese glutamatérgica

A via glutamatérgica também apresenta forte relação com a esquizofrenia. Nesta hipótese, o envolvimento do sistema glutamatérgico na esquizofrenia centra-se nos receptores ionotrópicos, sendo o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) o subtipo mais estudado e relevante para entender a fisiopatologia da esquizofrenia (LIN; LANE; TSAI, 2012). Essa teoria propõe que uma função diminuída do receptor NMDA pode ser um fator de predisposição à esquizofrenia (COYLE, 1996). O que ocorre nas conexões neuronais que explica esta hipótese é uma interação anatômica e funcional entre neurônios dopaminérgicos, glutamatérgicos e até mesmo gabaérgicos (Stephen, 2007).

O circuito neuronal glutamatérgico está envolvido diretamente com o dopaminérgico no córtex, ou seja, o neurocircuito glutamatérgico interage com o dopaminérgico, funcionando como um ativador deste último. Assim, em condições fisiológicas, quanto mais glutamato interage em receptores NMDA na via mesocortical, mais dopamina é liberada nesta mesma via. Na esquizofrenia ocorre uma hipofunção glutamatérgica nesta via, que promove, conseqüentemente, pouca liberação de dopamina no córtex, o que resulta em sintomas negativos e cognitivos (ARARIPE NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007; DEUTSCH et al., 1989; STAHL, 2007).

Já na via mesolímbica, em condições fisiológicas normais, os neurônios glutamatérgicos regulam a atividade de interneurônios gabaérgicos que inibem a liberação de

dopamina. Dessa forma, a hipofunção de receptores NMDA na via mesolímbica encontrada na esquizofrenia promove pouca estimulação dos interneurônios gabaérgicos, que, desta forma, não conseguem inibir o suficiente a liberação de dopamina nesta região, ou seja, a dopamina interage com receptores D2 muito mais preponderantemente do que o normal e isto precipita sintomas positivos (ARARIPE NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007; STAHL, 2007).

A teoria da hipofunção dos receptores NMDA é fundamentada pela evidência de que antagonistas dos receptores NMDA, como a fenciclidina e cetamina, induzem um quadro clínico semelhante à esquizofrenia com a presença de sintomas positivos, negativos e cognitivos, ao contrário da anfetamina, que só gera sintomas positivos (CHINDO et al., 2012; LIN; LANE; TSAI, 2012).

### 1.2.3. Hipótese neuroinflamatória

A ideia da hipótese neuroinflamatória foi inicialmente introduzida por Stevens em 1982. O pesquisador evidenciou a presença de marcadores inflamatórios no líquido cefalorraquidiano de pacientes esquizofrênicos correlacionando esses achados com a neuropatologia desta transtorno. Desde então, a associação entre doenças inflamatórias e esquizofrenia tem sido proposta (ARICIOGLU et al., 2016; MEYER; SCHWARZ; MÜLLER, 2011a, 2011b; MÜLLER et al., 2015; RÉUS et al., 2015).

Ademais algumas doenças auto-imunes parecem compartilhar uma série de características clínicas, epidemiológicas e genéticas com a esquizofrenia (BENROS et al., 2011; TOMASIK et al., 2014). Sendo sugerido também em estudos de perfil molecular que moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e imunorregulação estão alteradas em certas regiões cerebrais na esquizofrenia. Tais pesquisas mostram que há uma expressão alterada de marcadores relacionados ao sistema imune no córtex pré-frontal (FILLMAN et al., 2013) e temporal (WU et al., 2012) bem como no hipocampo (HWANG et al., 2013) de pacientes com esquizofrenia.

Reforçando essa conexão entre alterações imunológicas e esquizofrenia, foi observado uma elevada densidade de células da glia, que são conhecidas como células de defesa imunológica do sistema nervoso central (FILLMAN et al., 2013). A interação das células gliais, microglia e astrócitos, pode aumentar a produção de ácido quinolínico e ácido quinurênico por microglia e por astrócitos, respectivamente (KROKEN et al., 2014). O ácido quinurênico pode reduzir a liberação de glutamato, bem como a liberação de dopamina, ambas as quais podem contribuir para a disfunção cognitiva. Em contraste, o ácido quinolínico, contribui para a ativação do receptor NMDA e inibe a recaptção de glutamato, resultando em glutamato

extracelular excessivo, o que leva a peroxidação lipídica, excitotoxicidade, neurodegeneração (HAROON; RAISON; MILLER, 2012), fornecendo, assim, uma conexão direta entre a ativação imune e a neurotransmissão glutamatérgica na esquizofrenia.

Visto isso, um aumento na resposta inflamatória e no estresse oxidativo pode levar à inflamação, que por sua vez pode estimular a microglia no cérebro. A ativação microglial é despertada pelo fenótipo M1, que está associado a um aumento na interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (MEYER; SCHWARZ; MÜLLER, 2011b; RÉUS et al., 2015). Essa ativação imunológica é evidenciada em cerca de 40 % dos pacientes com esquizofrenia, sendo essa porcentagem semelhante a aquela observada entre indivíduos esquizofrênicos com anormalidades estruturais (ALLEN et al., 2009). Ademais, tanto pacientes sofrendo com o primeiro episódio da doença quanto aqueles em recaída demonstram níveis elevados de IL-1 $\beta$ , interleucina 6 (IL-6) e TGF- $\beta$ , que são normalizados quando os pacientes estão em tratamento antipsicótico; sendo, portanto consideradas marcadores de traço da esquizofrenia (MILLER et al., 2011). Desta forma, esses efeitos anti-inflamatórios dos antipsicóticos sobre os marcadores periféricos são acompanhados por uma capacidade de reduzirem a ativação microglial no SNC (MONJI; KATO; KANBA, 2009).

O interesse em melhorar a compreensão da fisiopatologia das doenças psiquiátrica vem movimentando a comunidade científica para ver a inflamação como um dos principais processos envolvidos nos transtornos. De fato, uma recente meta-análise mostra que os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , receptor solúvel de IL-2 (sIL-2R) e receptor de IL-1 antagonista (IL-1RA) foram significativamente aumentados em pacientes com esquizofrenia e em outros distúrbios psiquiátricos (GOLDSMITH; RAPAPORT; MILLER, 2016). Evidenciou-se que os mediadores estão sob o controle da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), apresentando níveis elevados durante a doença aguda e crônica, e reduzidos com o tratamento. (ALTINOZ et al., 2018; GOLDSMITH; RAPAPORT; MILLER, 2016)

O NF- $\kappa$ B é um importante fator de transcrição que regula uma ampla gama de processos celulares e vias de sinalização (LEZOUALC'H; BEHL, 1998). Por exemplo, quando superativado, o NF- $\kappa$ B pode autoinduzir sua produção via aumento de citocinas pró-inflamatórias e induzir um estado inflamatório (ALTINOZ; KORKMAZ, 2004). Visto isso, foi demonstrado que modelos de estresse em ratos e camundongos transgênicos aumenta a sinalização de NF- $\kappa$ B, levando a indução do estado de anedonia e inibição da neurogênese (KOO et al., 2010).

Contudo, a utilidade dos marcadores imunológicos para o diagnóstico e prognóstico da esquizofrenia ainda não foi bem estabelecida (TOMASIK et al., 2016). Isto porque o sistema

imunológico é dinâmico e sensível às mudanças, e, além disso, existem fatores como: predisposição genética, fatores de risco ambiental, fases da doença e efeitos colaterais da medicação antipsicótica que interferem nessa questão (TOMASIK et al., 2016).

Até o momento, o exato mecanismo pelo qual mudanças imunes conduzem à esquizofrenia permanece incerto (KELLER et al., 2013). Uma hipótese descreve que células microgлияis ativadas no SNC liberam citocinas pró-inflamatórias que levam à alterações neurais (neurogênese e degradação) que contribuem para o patofisiologia da esquizofrenia (MONJI; KATO; KANBA, 2009). Outra teoria postula que polimorfismos em genes que suportam a função imunológica influenciam o sistema microvascular do cérebro em relação a estímulos ambientais ou pré-natais (ANDERSON; MAES, 2013; HÄNNINEN et al., 2007; HANSON; GOTTESMAN, 2005).

#### 1.2.4. Hipótese neurodesenvolvimental

A hipótese neurodesenvolvimental da esquizofrenia vem ganhando destaque. Ela propõe que, embora a fase mais grave da doença geralmente ocorra no período da adolescência e início da fase adulta, suas raízes encontram-se nas fases precedentes do desenvolvimento do cérebro (MEYER; MACCABE, 2016).

Esta hipótese estabelece que os genes relevantes envolvidos no desenvolvimento do cérebro são suscetíveis às interações gene-ambiente, principalmente durante o segundo trimestre da gestação, o que leva à interrupção de trajetórias do desenvolvimento cerebral, à desorganização do sistema límbico e à desequilíbrios neuroquímicos, por exemplo, dopaminérgicos (WEINBERGER, 1995). Assim, diversos insultos que ocorrem durante as fases iniciais de neurodesenvolvimento podem prejudicar a maturação cerebral tardia pós-natal através da ativação de circuitos neurais patológicos durante a adolescência ou idade adulta jovem, acarretando um aumento da vulnerabilidade à esquizofrenia (BROWN, 2011b; FATEMI; FOLSOM, 2009; NESTLER; HYMAN, 2010).

Muitos estudos mostram essa associação entre a incidência de processos inflamatórios durante o período vulnerável de desenvolvimento do SNC e o risco aumentado de transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia (TEJKALOVÁ; KLASCHKA; RŮŽIČKOVÁ, 2012). Ou seja, respostas inflamatórias podem indicar um fator de vulnerabilidade na psiquiatria geral, resultando em um aumento da carga de estresse em indivíduos com doenças psiquiátricas. Dessa forma, ao longo dos anos tem-se observado uma maior incidência de sintomas

neuropsiquiátricos durante ou na sequência de uma grande infecção ou alteração no sistema imunológico (FEIGENSON; KUSNECOV; SILVERSTEIN, 2014).

Dessa forma, nas últimas duas décadas, as pesquisas se direcionaram para a realização de modelos neurodesenvolvimentais de esquizofrenia, que visam identificar processos etiológicos em que o cérebro, após eventos desencadeantes específicos, se desenvolve em um "cérebro tipo esquizofrenia" ao longo do tempo (MEYER; FELDON, 2012a). Nesse sentido, o desafio imune perinatal, particularmente, gerou avanços substanciais, uma vez que pode imitar longitudinalmente vários aspectos comportamentais e neurobiológicos desse transtorno (MEYER et al., 2008).

#### 1.2.5. Estresse oxidativo e esquizofrenia

Ultimamente, as pesquisas sobre marcadores de estresse oxidativo veem ressaltando a importância do estresse oxidativo na fisiopatologia da esquizofrenia (HUANG; LIU, 2017; PADURARIU et al., 2010) e de outras alterações mentais. Visto que o cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido à sua alta utilização de oxigênio, seu alto teor de ácidos graxos oxidáveis polinsaturados e a presença de metais redox ativados ( $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+2}$ ) (DO et al., 2009), além de conter um nível relativamente baixo de enzimas antioxidantes (MONICZEWSKI et al., 2015).

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ocorrem quando há um desequilíbrio na produção de energia dos organismos eucariotos via mitocôndria, cujos processos incluem a fosforilação oxidativa/síntese de ATP, oxidação de ácidos graxos e aminoácidos e o Ciclo de Krebs. Esse desequilíbrio no metabolismo promove a geração de subprodutos tóxicos como superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e radicais de hidroxila que são propensos a causar danos no DNA, enzimas, proteínas, entre outros componentes celulares (KOGA; SERRITELLA; SEDLAK, 2016).

O estresse oxidativo ocorre, portanto, quando há um desequilíbrio entre a manifestação sistêmica de EROs e a capacidade do organismo para eliminá-las (WATKINS; ANDREWS, 2016). A fim de prevenir o dano oxidativo, o corpo contém um grande número de enzimas capazes de eliminar as EROs, entre elas: catalase, superóxido dismutase (SOD), tioredoxina, e outras enzimas que utilizem a glutatona como co-fator. No entanto, quando desreguladas, as enzimas capazes de eliminar as EROs acabam favorecendo ao aumento de doenças em que o estresse oxidativo e a inflamação ocorrem, incluindo as doenças neurodegenerativas (KOGA; SERRITELLA; SEDLAK, 2016).

Isto ocorre porque o processo inflamatório e o estresse oxidativo estão intensamente interligados, já que para acabar com as doenças infecciosas o sistema imunológico produz quantidades letais de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (QUINN; AMMONS; DELEO, 2006). Além disso, moléculas oxidativas ativam muitos mediadores inflamatórios (STEULLET et al., 2016).

Um dos fatores que suportam a desregulação do sistema redox na fisiopatologia da esquizofrenia são estudos relatando que na esquizofrenia ocorre uma diminuição de compostos antioxidantes e aumento de compostos oxidantes. De fato, existem múltiplas linhas de pesquisa evidenciando o aumento do estresse oxidativo em pessoas com esquizofrenia, seja através da mensuração de compostos oxidantes e antioxidantes (glutathiona, SOD, catalase), de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo, de produtos da oxidação (malonaldeído, mensurado pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ou através de estudos pré-clínicos e clínicos com antipsicóticos e outras drogas (AL-ASMARI; KHAN, 2014; COUGHLIN et al., 2013; KOGA; SERRITELLA; SEDLAK, 2016).

Muitos estudos concluíram que uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, bem como dano oxidativo de membranas pelo aumento na peroxidação lipídica estão associadas a alguns sintomas clínicos da esquizofrenia. Sem dúvida, os produtos de oxidação, danificam o tecido neuronal o que pode não ser a causa primária, contudo pode contribuir na patogênese e deterioração da esquizofrenia, além de indicar um pior prognóstico (FENDRI et al., 2006; HUANG; LIU, 2017).

Na tentativa de compreender a estreita relação entre o estresse oxidativo e a lesão neuronal induzida no modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia, medimos os níveis de TBARS e Nitrito no plasma e nos homogenatos hipocampais dos camundongos.

### **1.3. A importância do pródromo na esquizofrenia**

O termo pródromo tem sido usado na esquizofrenia para se referir à fase que antecede o aparecimento inicial do surto psicótico, iniciando primeiramente com a mudança de comportamento (HERZ, 1999). Os principais sinais prodrômicos são: ansiedade, humor deprimido, isolamento social e alterações do sono, e ocorrem naqueles pacientes que desenvolverão quadros psicóticos (MOCHCOVITCH, 2015). Nesse período, os pacientes estão em estado mental de "risco ultraelevado" (*“ultra high-risk”*), e apresentam sintomas psicóticos com intensidade, frequência ou duração insuficientes para receberem o diagnóstico de uma psicose (SOUZA et al., 2013).



O interesse na fase prodrômica da esquizofrenia tem aumentado cada vez mais. Estudos com pacientes esquizofrênicos sugeriram que quanto mais cedo forem administrados os antipsicóticos mais eficaz o tratamento será. Tal fato levou a suposição de que se o tratamento fosse iniciado antes do início do primeiro surto o prognóstico do transtorno seria melhor. Em função disso, nos últimos 20 anos pesquisadores começaram a usar a fase prodrômica como o ponto ideal para iniciar a intervenção farmacológica (SOMMER et al., 2016; YUNG et al., 2008).

O desafio é, portanto, a identificação do pródromo através do desenvolvimento de critérios que sejam capazes de reconhecer pessoas com uma alta probabilidade de desenvolver a psicose, ou seja, maximizar os “verdadeiros positivos” e minimizar os “falsos positivos” (MCGORRY; GOLDSTONE, 2011). Uma estratégia para atingir esse objetivo tem sido o desenvolvimento dos critérios para pacientes *Ultra High Risk*. Estes critérios combinam vários fatores de risco, com o intuito de determinar o nível de risco no grupo selecionado. Um deles é o fator de risco da idade, adolescência e idade adulta jovem, já que esta é a faixa etária de maior incidência de psicose, combinada com fatores de risco clínicos e histórico familiar (ADDINGTON; HEINSEN, 2012; BORA et al., 2014).

De acordo com Yung et al., (2008) os critérios de identificação de pacientes com risco ultraelevado são: sintomas psicóticos positivos subliminares/ atenuados; sintomas psicóticos autolimitados, curtos e com resolução espontânea e história familiar de transtorno psicótico em parentes de primeiro grau. Embora os sintomas negativos não estejam entre os critérios propostos, estudos com pacientes em risco ultraelevado observaram déficits substanciais em domínios cognitivos e pouca interação social em jovens com sintomas psicóticos atenuados (ADDINGTON; HEINSEN, 2012; BORA et al., 2014). Outro desafio é encontrar drogas seguras para o uso nessa fase, sem tantos efeitos colaterais quanto os antipsicóticos (MCGORRY; GOLDSTONE, 2011).

De fato, o aumento da duração da psicose não tratada é associada a um pior prognóstico (ALTAMURA; BUOLI; SERATI, 2011; KESHAVAN; AMIRSDRI, 2007). Por exemplo, pacientes que tiveram um maior tempo para iniciar o tratamento farmacológico demonstraram pior resposta ao tratamento e pior funcionamento social em comparação com esquizofrênicos com uma curta latência ao tratamento (MARSHALL et al., 2005; OWENS et al., 2010; SIMONSEN et al., 2007), devido à redução da morbidade e melhor qualidade de vida para os pacientes e suas famílias (LEE; MCGLASHAN; WOODS, 2005).

Métodos para prevenir doenças ou reduzir o seu impacto negativo são classificados em categorias: primárias, secundárias e terciárias. A prevenção primária envolve os programas de

educação sobre a associação de complicações obstétricas e aumento do risco de esquizofrenia. A prevenção secundária envolve intervenção na fase prodrômica, ou seja, refere-se a esforços para reduzir a progressão da doença entre aqueles com fatores de risco graves ou com doença precoce. Já a prevenção terciária significa abordagens para reduzir o impacto da doença existente por reabilitação para restaurar a função e prevenir complicações relacionadas à doença (CAPLAN, 1964; LEE; MCGLASHAN; WOODS, 2005). O foco dessa pesquisa é a prevenção secundária por ser mais adequada para o tema e para o protocolo de prevenção do modelo de esquizofrenia adotado.

#### **1.4. Modelo animal de “dois desafios”**

A exposição à infecção no período neonatal e o trauma psicológico ocorrido na puberdade configuram dois fatores de risco ambientais implicados na etiologia de distúrbios neuropsiquiátricos, como esquizofrenia (BROWN, 2011a), autismo (ATLADOTTIR et al., 2012) e transtorno bipolar (PARBOOSING et al., 2013). Entretanto, ainda encontram-se ausentes as evidências epidemiológicas que mostrem o impacto cumulativos desses desafios ambientais na vulnerabilidade às transtornos psiquiátricas crônicas (GIOVANOLI; WEBER; MEYER, 2014). Assim, modelos pré-clínicos têm mostrado as consequências de exposições combinadas de ativação imune pré-natal e estresse na puberdade, o chamado modelo de “dois-desafios” (GIOVANOLI et al., 2013a).

O modelo de dois desafios proposto por Keshavan e Hogarty (1999) trabalha a hipótese neurodesenvolvimental, na qual o prejuízo no desenvolvimento durante dois períodos críticos combinados (fase de desenvolvimento precoce cerebral e a adolescência) levam a sintomas associados com a esquizofrenia. De acordo com este modelo, utiliza a injeção de padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPs (“*Pathogen-associated molecular pattern*” ou “*PAMPs*”), como a partícula viral mimética *polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly (I:C)), administrada durante o período inicial de desenvolvimento animal para mimetizar a infecção pré-natal (GIOVANOLI et al., 2013a).

O uso da poly(I:C), um análogo sintético do RNA viral de cadeia dupla, tem gerado um grande impacto sobre os pesquisadores que se concentram na base neurodegenerativa e neuroimunológica de distúrbios cerebrais humanos complexos, como a esquizofrenia (MEYER; FELDON, 2012b). Poly(I:C) leva a ativação de citocinas pró-inflamatórias através da ativação de receptores Toll-like 3, imitando a resposta de fase aguda de uma infecção viral (MACÊDO et al., 2012; WANG et al., 2004).

Alguns estudos mostram a associação entre a incidência de processos inflamatórios durante o período vulnerável de desenvolvimento do SNC e o risco aumentado de transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia (BROWN et al., 2004; TEJKALOVÁ; KLASCHKA; RŮŽIČKOVÁ, 2012). Ou seja, respostas inflamatórias podem indicar um fator de vulnerabilidade na psiquiatria geral, resultando em um aumento da carga de estresse em indivíduos com doenças psiquiátricas. Dessa forma, ao longo dos anos tem-se observado uma maior incidência de sintomas neuropsiquiátricos durante ou na sequência de uma grande infecção ou alteração no sistema imunológico (FEIGENSON; KUSNECOV; SILVERSTEIN, 2014).

O segundo “desafio” ocorre na adolescência, quando a eliminação excessiva de sinapses e perda de plasticidade pode explicar o surgimento dos sintomas (KESHAVAN, 1999). A vulnerabilidade do período da adolescência ocorre devido aos processos neuromaturacionais que ocorrem nesta fase, como o aumento da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), assim como um declínio normativo no volume de matéria cinzenta cortical, que desempenham um papel importante na expressão clínica da esquizofrenia (FEINBERG, 1982). Por isso, a exposição a eventos traumáticos durante a adolescência parece aumentar o risco de psicose (MAYNARD et al., 2001).

Visto isso, a exposição inicial como um insulto ambiental, tal como infecção, pode deixar a prole mais vulnerável para o efeito patológico de um segundo estímulo pós-natal, tal como estresse (GIOVANOLI et al., 2013b). Assim, a hipótese dos “dois desafios” sugere que a combinação da exposição neonatal a componentes virais ou bacterianos juntamente com um insulto durante a adolescência pode aumentar as chances de um surto tardio no indivíduo e, em último caso, levar ao aparecimento da síndrome clínica completa (BAYER; FALKAI; MAIER, 1999). Combinados, a resposta imune e/ou inflamação e eventos estressores podem ser considerados válidos na conceituação multifatorial da hipótese dos “dois desafios” e do desenvolvimento da esquizofrenia.

### **1.5. Tratamento farmacológico da esquizofrenia**

Antes do surgimento dos antipsicóticos, o tratamento da esquizofrenia era baseada na terapia por choque elétrico, coma insulínico e leucotomia pré-frontal (SWAYZE, 1995). Visto isso, a descoberta da clorpromazina no início dos anos 1950 representou um grande marco na farmacoterapia da esquizofrenia (MIYAMOTO et al., 2008).

Os antipsicóticos são um grupo heterogêneo de drogas psicoativas e têm sido a base do tratamento da esquizofrenia nos últimos cinquenta anos. São agrupados em duas categorias: típicos e atípicos (FALKAI et al., 2006).

Os antipsicóticos típicos, os quais incluem fenotiazinas (iniciando com a clorpromazina), as butirofenonas (haloperidol), e as tioxantinas, são bastante efetivos na redução dos sintomas positivos (alucinações e delírios) (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010), porém, em relação aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia, apresentam eficácia reduzida (CHAN, 2017). Os antipsicóticos típicos são caracterizados também por produzirem sintomas extrapiramidais, reações de distonias agudas, parkinsonismo subagudo e acatisia, e seu uso crônico poderá levar a discinesia e distonias tardias (MELTZER et al., 2003).

No entanto, com a introdução dos fármacos antipsicótico “atípicos” na década de 1990, houve uma diminuição substancialmente dos efeitos secundários extrapiramidais indesejados. Os antipsicóticos atípicos foram elaborados para serem mais eficazes no tratamento de pacientes refratários e na diminuição do comportamento suicida, bem como apresentar boa atuação sobre os sintomas negativos e menor incidência de efeitos motores secundários a curto e longo prazo (MARSH; RAO, 2002). Assim, foram desenvolvidos mais medicamentos da classe dos atípicos, como risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprazidona e amisulpride (LIEBERMAN, 1996; TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010). No entanto, estes podem apresentar outros efeitos como aumento de peso, resistência à insulina e anormalidades lipídicas (KAPUR; REMINGTON, 2001).

Um terço a quinto dos pacientes diagnosticados com esquizofrenia não respondem aos antipsicóticos prescritos, e são considerados resistentes ao tratamento, intolerantes ao tratamento, ou apenas respondem parcialmente (MIYAMOTO et al., 2012). Para esses pacientes a clozapina tem sido a droga mais extensivamente estudada já que ela é o único antipsicótico aprovado pelo FDA para pacientes resistentes (CONLEY; KELLY, 2001). Porém, a clozapina não pode ser utilizada como um fármaco de primeira escolha devido a restrições legais que surgem com o alto risco de indução de agranulocitose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Resultados de estudos em grande escala, comparando a eficácia das drogas típicas contra drogas atípicas na esquizofrenia parecem indicar que as drogas de atípicas não são mais eficazes do que as típicas e não estão associadas com melhores resultados cognitivos ou sociais (KEEFE et al., 2007; LIEBERMAN, 2007). No entanto, alguns estudos relatam que os antipsicóticos de segunda geração favorecem a adesão do paciente ao tratamento quando

comparados aos de primeira, uma vez que é menor a incidência de sintomas extrapiramidais (LAHON et al., 2012).

### **1.6. Candesartana**

A inibição de citocinas pró-inflamatórias ou o aprimoramento de mediadores anti-inflamatórios em pacientes esquizofrênicos pode ser uma estratégia benéfica para prevenir as consequências devastadoras desta doença em relação ao dano e função neuronal (RÉUS et al., 2015). Levando em conta que os tratamentos atuais para esquizofrenia encontram-se não apenas com eficácia limitada, mas também são frequentemente associados com efeitos colaterais graves, o interesse no desenvolvimento de terapias alternativas estão em alta (SHUNGU, 2012). Visto isso, substâncias com potencial anti-inflamatório, como a candesartana, tornam-se um alvo para a neurociência.

A candesartana é um medicamento que age no sistema renina-angiotensina (SRA) através do antagonismo do receptor AT1 da angiotensina II. Sua principal indicação é o tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS), pois além de reduzir eventos cardiovasculares e renais, tem ação anti-inflamatória (GLEITER et al., 2006; SAAVEDRA; SÁNCHEZ-LEMUS; BENICKY, 2011). O SRA desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial e homeostase dos fluidos corporais, e a disfunção destes está implicada na patogênese da HAS (ITO et al., 1995; PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006).

O principal produto biologicamente ativo do SRA é a angiotensina II (MCKINLEY et al., 2003), seus efeitos são geralmente mediados por dois subtipos de receptores, AT1R e AT2R (MEHTA; GRIENGLING, 2007). Os receptores do tipo AT1 são receptores acoplados à proteína G e no cérebro são localizados em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia do córtex, hipocampo e gânglios da base (LABANDEIRA-GARCIA et al., 2017) sendo sua ativação pela angiotensina II responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos e patológicos da ativação do SRA (SAAVEDRA; BENICKY; ZHOU, 2006b).

A Angiotensina II do cérebro, através de seus receptores AT1, modula a neurotransmissão dopaminérgica, glutamatérgica e GABAérgica, responsáveis pela regulação do movimento, emoções, cognição, respostas ao estresse e resposta do cérebro à inflamação endógena e periférica (BASMADJIAN et al., 2017; BENICKY et al., 2011a; SAAVEDRA, 2012a). Alterações destas funções, juntamente com os componentes do SRA cerebral alterados, têm sido implicadas em vários transtornos do cérebro como depressão, Parkinson, Alzheimer, distúrbio bipolar e esquizofrenia. (BASMADJIAN et al., 2017; DE GÓIS QUEIROZ et al., 2013; ELKAHLOUN; HAFKO; SAAVEDRA, 2016; GARD, 2004).

Além disso, pouco se sabe sobre esquizofrenia e o SRA; entretanto, a Angiotensina II está intimamente relacionada às vias de dopamina e glutamato, que são alteradas principalmente nessa patologia. Dentro da via dopaminérgica, a ligação de angiotensina II a AT1R desempenha um papel facilitando a liberação de dopamina (MARCHESE et al., 2016; PAZ et al., 2011). Tendo isso em mente, um estudo prévio relatou que o pré-tratamento *in vitro* com candesartana, foi capaz de atenuar a liberação de dopamina induzida por Anfetamina em fatias de caudate-putamen e nucleus accumbens, mostrando, assim, que a ativação de AT1R está relacionada com as alterações neuroadaptativas induzidas pela anfetamina (PAZ et al., 2011).

A diminuição da atividade do SRA pode ser alcançada pelo bloqueio da formação de Angiotensina II com inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou com bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA), como a candesartana. De fato, pesquisas anteriores demonstraram diferentes propriedades ansiolíticas e neuroprotetoras dos fármacos BRAs (BENICKY et al., 2011a; SAAVEDRA; BENICKY; ZHOU, 2006b; TIMARU-KAST et al., 2012). Outrossim, o antagonismo desses receptores melhora o estresse oxidativo (BILD et al., 2013), aumenta os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (KISHI; HIROOKA; SUNAGAWA, 2012), melhorando também a saúde cerebrovascular sob hipertensão, a remodelação vascular cerebral patológica e a inflamação vascular cerebral (BENICKY et al., 2011b; SAAVEDRA, 2005, 2012a).

O estresse oxidativo aparenta ter um impacto significativo na patogênese da hipertensão arterial (BOTELHO-ONO et al., 2011; OLIVEIRA-SALES et al., 2008). Estudos indicam que a Angiotensina II estaria envolvida neste processo, pois, ao se ligar ao receptor AT1, desencadeia a ativação da enzima NADPH oxidase, que acarreta um aumento de espécies reativas de oxigênio. Essas substâncias, por sua vez, quando em excesso no cérebro são capazes de reduzir a sensibilidade do baroreflexo cardíaco, levando a um descontrole da pressão arterial. Ademais, a NADPH oxidase produz quantidades significativas de superóxido, o qual pode reagir com óxidos de nitrogênio formando assim o peroxinitrito, uma substância com alto poder oxidante (DE QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013). Assim, é possível observar uma ligação entre a ativação de receptores AT1 pela Ang II e a produção de estresse oxidativo, fator importante na fisiopatologia dos pacientes com esquizofrenia (BOŠKOVIĆ et al., 2011; HUANG; LIU, 2017).

A inflamação do cérebro tem um papel crítico na fisiopatologia de doenças cerebrais de alta prevalência e impacto econômico, como a esquizofrenia. Um estudo envolvendo um modelo de Inflamação cerebral demonstrou que a administração sistêmica de candesartana (1

mg / kg por dia) a ratos normotensos diminui a resposta inflamatória cerebral aguda à administração do lipopolissacarídeo de endotoxina bacteriana (LPS) (BENICKY et al., 2011b)

Dessa forma, embora a Candesartana seja reconhecida pela sua ação anti-hipertensiva (GLEITER et al., 2006), ela também desempenha papéis importantes em muitos sistemas fisiológicos do sistema nervoso central incluindo os distúrbios psiquiátricos (DE SOUZA GOMES et al., 2015; TIMARU-KAST et al., 2012; YAGI et al., 2013), como a esquizofrenia. No entanto, o espectro das atividades químicas e bioquímicas da candesartana é amplo e não está totalmente compreendido, sendo assim, utilizada na tese na tentativa de elucidar as vias de proteção pela qual a mesma age.

### **1.7. Influência do sexo na esquizofrenia**

Ultimamente, quando se trata de início do surto psicótico, severidade dos sintomas e desfecho da esquizofrenia, tem-se mencionado a diferença de gênero sob a hipótese de que os hormônios sexuais também exercem um papel na etiologia e tratamento da esquizofrenia (GOGOS et al., 2015).

A observação inicial sobre as diferenças de sexo na esquizofrenia se deu devido ao fato que homens e mulheres apresentam idades diferentes do primeiro surto, onde em homens ocorre em uma idade mais jovem em comparação com as mulheres (HÄFNER et al., 1991). Assim, o início do surto psicótico ocorre entre 18 e 24 anos nos homens, enquanto que nas mulheres ocorre cerca de 4 anos mais tarde (ERANTI et al., 2013). Entretanto, apenas mulheres com esquizofrenia sofrem um segundo pico de surto, geralmente aos 45 a 50 anos de idade (HÄFNER et al., 1993), e o curso da doença nas mulheres é menos severo quando comparado com os homens (OCHOA et al., 2012). Outras diferenças de sexo já relatadas são que as mulheres apresentam menos sintomas graves do tipo negativos, porém mais sintomas dos tipos positivos e afetivos, além de terem uma resposta mais favorável ao tratamento com antipsicótico (BEGEMANN et al., 2012).

Diferenças de sexo na esquizofrenia têm sido extensivamente estudadas e está cada vez mais aceito que os esteróides gonadais são fortemente implicados nesse fenômeno. A hipótese estipulada para as diferenças de gênero citadas é de que os hormônios esteroides gonadais são capazes de desempenhar um papel protetor nas mulheres contra o desenvolvimento da esquizofrenia (COHEN et al., 1999; GOGOS et al., 2015). Dessa forma, os picos de surto esquizofrênico que ocorrem na mulher pouco depois da puberdade e depois da transição da menopausa podem ser definidos por níveis de estrogênio flutuantes,

especificamente estradiol, que é o hormônio primário do sexo feminino (SEARLES; MAKAREWICZ; DUMAS, 2017).

O efeito do estrogênio tem sido amplamente pesquisado e postula que o mesmo exerce um efeito protetor ao neutralizar as fêmeas contra o desenvolvimento e a gravidade da doença (GOGOS et al., 2015). Esse hormônio gonadal pode exercer efeitos em várias regiões do cérebro, afetando a cognição, o comportamento e o humor (FINK et al., 1996). Sendo também observado, nas duas últimas décadas, um papel neuromodulador do estrogênio na patogênese e na terapêutica de transtornos neuropsiquiátricos, incluindo a esquizofrenia (GOGOS et al., 2015). Visto isso, torna-se importante a pesquisa em ambos os sexos para se determinar a influencia do sexo no modelo dois “dois desafios” e no efeito terapêutico da candesartana.



## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O efeito insuficiente da farmacoterapia atual sobre os sintomas negativos e déficits cognitivos reflete nossa má compreensão da etiologia da esquizofrenia (AGID; KAPUR; REMINGTON, 2008; LEUCHT et al., 2009; TANDON et al., 2008). Assim, o desenvolvimento de modelos animais desse transtorno torna-se uma ferramenta importante para esclarecer sua fisiopatologia e facilitar o progresso de novas terapêuticas. Nessa perspectiva, a tese em questão, estuda o modelo neurodesenvolvimental de “dois desafios”, o qual possui vantagens sobre outros modelos, pois permite realizar investigações comportamentais, eletrofisiológicas e neuroquímicas na ausência de intervenções cirúrgicas ou de drogas que possam interferir nos resultados (JONES et al., 2011).

Além disso, o modelo de “dois desafios” da esquizofrenia é um modelo recente capaz de simular a etiologia da esquizofrenia em humanos (GIOVANOLI et al., 2013b; MONTE et al., 2017b), possuindo validade de face, constructo e validade preditiva (JONES et al., 2011). Visto isso, esse modelo pode ser empregado para resolver a questão controversa relacionada às intervenções preventivas em indivíduos psicóticos de risco “ultraelevado”(COMPTON, 2004).

A prevenção em transtornos crônicos e incapacitantes como a esquizofrenia é particularmente importante (MORGAN et al., 2014). Isto porque a longa duração da psicose não tratada está associada a mudanças cerebrais estruturais, a déficits cognitivos que irão ocorrer no primeiro episódio de psicose e a um pior prognóstico da doença (BORA et al., 2017). Visto isso, o interesse na fase prodrômica da esquizofrenia tem aumentado devido à hipótese de que se a intervenção farmacológica fosse iniciada antes do início do primeiro surto o prognóstico do transtorno seria melhor (SOMMER et al., 2016; YUNG et al., 2008).

Assim, acumulam-se provas sugerindo que a intervenção psicossocial e farmacológica precoce pode ser benéfica para atrasar ou prevenir o aparecimento de psicose (FUSAR-POLI et al., 2012). No entanto, atualmente, não existe uma prevenção estabelecida para os sujeitos em estado mental de "risco ultraelevado" para a psicose. Particularmente, o uso de antipsicóticos para a prevenção da psicose é controverso e os riscos e benefícios potenciais associados ao seu uso no pródromo permanecem incertos (MIYAKE et al., 2016).

Apesar de décadas de intensa pesquisa e desenvolvimento, os tratamentos atuais para esquizofrenia encontram-se não apenas com eficácia limitada, mas também são frequentemente associados com efeitos colaterais graves, justificando, assim, o maior interesse no desenvolvimento de terapias alternativas eficazes e seguras para a fase prodrômica da esquizofrenia (MCGORRY; GOLDSTONE, 2011). Visto isso, potenciais agentes

neuroprotetores com ação antioxidante e anti-inflamatória, tais como Candesartana, tornam-se alvos na perspectiva da prevenção de alguns dos déficits neuropatológicos característicos da esquizofrenia (REDDY; REDDY, 2011; VIDOVIĆ et al., 2014).

A candesartana é um medicamento que age no sistema renina-angiotensina (SRA) através do antagonismo do receptor AT1 da angiotensina II. No cérebro, a Angiotensina II através da estimulação do receptor AT1 é um fator regulador com múltiplas ações, estando envolvida na regulação do estresse, nos sistemas autônomo e hormonal, na circulação, na resposta do cérebro à inflamação endógena e periférica e comportamento (BENICKY et al., 2011a; SAAVEDRA, 2012a; SAAVEDRA; SÁNCHEZ-LEMUS; BENICKY, 2011).

Desta forma, a Candesartana ao bloquear os receptores AT1 de angiotensina II demonstra diferentes propriedades neuroprotetoras e ansiolíticas (BENICKY et al., 2011a; SAAVEDRA; BENICKY; ZHOU, 2006b; TIMARU-KAST et al., 2012). Além disso, reduz o estresse oxidativo (BILD et al., 2013), aumenta os níveis de BDNF (KISHI; HIROOKA; SUNAGAWA, 2012), melhorando também a saúde cerebrovascular sob hipertensão, a remodelação vascular cerebral patológica e a inflamação vascular cerebral (BENICKY et al., 2011b; SAAVEDRA, 2005, 2012a). Assim, os antagonistas do receptor AT1 administrados oralmente podem ser considerados como novos compostos terapêuticos para o tratamento de doenças do sistema nervoso central quando o stress, a inflamação e a isquemia desempenham papéis importantes.

Nesse contexto, pretende-se com este trabalho defender a tese de que a CAND, um composto com propriedades antioxidantes e anti-inflamatória é capaz de prevenir os sintomas comportamentais e neuroquímicos do tipo esquizofrenia em camundongos que sofreram desafio imune neonatal induzido pela partícula viral poly(I:C) e passaram por eventos estressores durante a puberdade, evidenciando as possíveis influências do sexo no efeito deste fármaco. Esperamos, portanto, que nossos resultados contribuam para a compreensão das alterações neurobiológicas subjacentes à exposição de ocorrências e às diferenças de sexo na esquizofrenia, bem como contribua para a prevenção deste transtorno.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar a influência do sexo e do tratamento preventivo da CAND sobre alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por desafio imune neonatal por partícula vírus-símile combinado a estresse na adolescência.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a influência do sexo e do tratamento com a CAND nos sintomas esquizofreniformes do tipo positivo, negativo e cognitivo de animais submetidos aos desafios de estimulação imune neonatal do 5º ao 7º dia de vida e a eventos estressores na fase peripuberal;
- Determinar alterações oxidativas (TBARS e Nitrito) no hipocampo e no plasma de animais submetidos ao modelo de dois desafios, avaliando a influência do sexo e o tratamento com a CAND na adolescência.
- Determinar alterações inflamatórias (IL4, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ ) no hipocampo de animais submetidos ao modelo de dois desafios, avaliando a influência do sexo e o tratamento com a CAND na adolescência.
- Determinar as alterações na expressão de proteínas hipocampais intracelulares relacionadas à esquizofrenia: AT1R e NF $\kappa$ b em animais machos e fêmeas expostos ao modelo de dois desafios e submetidos ao tratamento preventivo com CAND.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais

Foram utilizadas matrizes de camundongos Swiss adultos machos e fêmeas oriundos do biotério da Universidade Federal do Ceará. As matrizes adultas recebidas foram ambientadas por uma semana e colocadas para acasalamento (machos : fêmeas = 1 : 3) para a obtenção dos filhotes utilizados nos experimentos. As fêmeas grávidas foram monitoradas para o dia do parto, que foi contado como dia pós-natal 1 (PN1). Todos os animais foram mantidos a uma temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ), com ciclos claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00 da manhã) e com alimento e água *ad libitum*, exceto durante os experimentos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEUA-UFC) sob número 72/15 e os experimentos seguiram os requisitos legais e éticos fornecidos pelo Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (NIH, 1996) bem como de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

### 4.2. Drogas

Polyinosinic:polycytidylic (Poly (I:C)) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi diluído em salina para a concentração de 2mg/kg de peso e administrado em um volume de injeção de 30  $\mu\text{l}$ /8 g de peso, via intraperitoneal (i.p). Candesartana (CAND) (AstraZeneca do Brasil Ltda) foi suspensa em carboximetilcelulose (CMC) 0.5% para a concentração de 0,3 mg/kg de peso do animal e administrada pela via oral (v.o.) com agulha curva de gavagem para camundongos em um volume de 0,1 mL/10g de peso. As doses de CAND (DE SOUZA GOMES et al., 2015; ISHRAT et al., 2015) e Poly (I:C) (GIOVANOLI et al., 2013a) foram baseadas em estudos anteriores.

### 4.3. Protocolo Experimental

Os animais foram conduzidos conforme o protocolo experimental do modelo de esquizofrenia dos dois desafios (“*two-hits model*”) induzido por estimulação imune pós-natal (primeiro desafio) e estresse na adolescência (segundo desafio). O modelo de esquizofrenia realizado é baseado em um estudo recentemente publicado e simula a etiologia da esquizofrenia em humanos (GIOVANOLI et al., 2013b; MONTE et al., 2017b). O modelo animal original de esquizofrenia por dois desafios é baseado na exposição materna a uma dose fisiologicamente

relevante de poly(I:C) no nono dia gestacional, considerada como o primeiro desafio, seguida por eventos estressores na fase peripuberal como um segundo desafio (GIOVANOLI et al., 2013a). No entanto, o cérebro dos roedores ainda encontra-se em desenvolvimento e maturação significativa no início da vida pós-natal (SEMPLE et al., 2013).

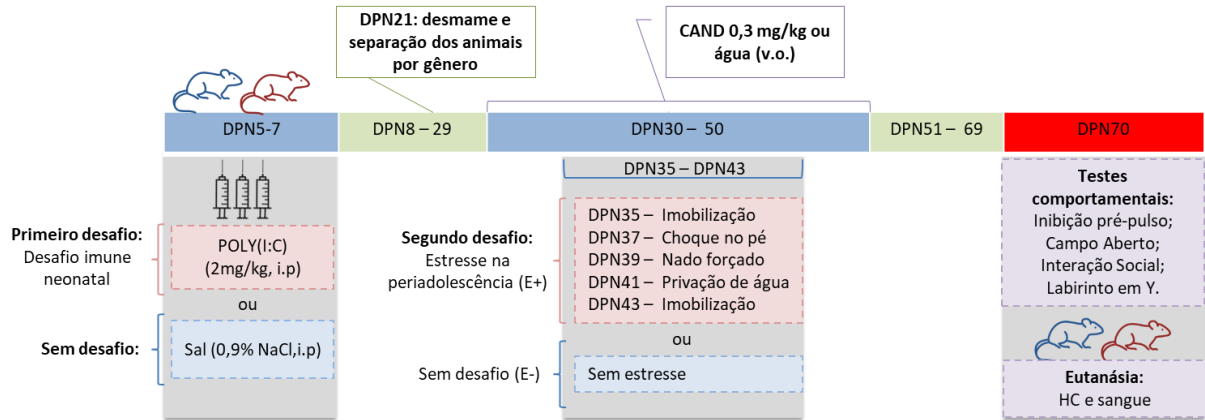


Fig. 2. Protocolo experimental. DPN: dia pós-natal. CAND: Candesartana, Sal: Salina. (Fonte: Do próprio autor).

Nesse sentido, após o nascimento, os filhotes foram divididos de forma randomizada em 2 grupos iniciais (primeiro desafio ou sem desafio) como descrito na **figura 2**. No primeiro desafio, o análogo de RNA viral, Poly (I:C) 2 mg/kg, foi administrado via i.p. nos camundongos nos dias pós-natais (DPNs) 5, 6 e 7. Para os animais controles foi administrada solução salina. Poly(I:C) ou Sal foram administrados em um volume de 30  $\mu$ l/ 8 g de peso corporal. Estes dias equivalem ao fim do terceiro trimestre da gravidez para os seres humanos (SEMPLE et al., 2013), que corresponde a um período vulnerável para distúrbios de desenvolvimento, uma vez que o acometimento de infecções virais nessa fase da gestação humana está associado a um risco aumentado para a psicose na prole quando adulta (BUKA et al., 2008). Os filhotes foram mantidos com suas respectivas genitoras em gaiolas, até o desmame no DPN21, onde foram separados de acordo com o sexo, tratamento e segundo desafio (Estresse ou sem desafio), de maneira que cada grupo contivesse um “n” de 10 a 15 animais oriundos de pelo menos seis proles diferentes. O modelo experimental contou com um total de 8 grupos (Tabela 1).

<i>Sexo</i>	<i>Primeiro desafio (DPN 5-7)</i>	<i>Segundo desafio (DPN 35-43)</i>	<i>Tratamento (DPN 30-50)</i>	<i>Grupo experimental</i>
<i>M e F</i>	Sal	-	Água	Sal / E-
<i>M e F</i>	Sal	-	CAND	Sal / E- / CAND
<i>M e F</i>	Poly(I:C)	Estresse	Água	Poly (I:C) / E+
<i>M e F</i>	Poly(I:C)	Estresse	CAND	Poly (I:C) / E+ / CAND

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais. DPN: dia pós-natal, M: machos, F: fêmeas, CAND: Candesartana, Sal: Salina, E<sup>+</sup>: expostos ao estresse; E<sup>-</sup>: não expostos ao estresse.

Para a indução dos dois desafios os animais foram submetidos, além da injeção de poly I:C no período pós-natal, a eventos estressantes na adolescência (segundo desafio). O protocolo de estresse sub-crônico variável incluiu cinco eventos estressores imprevisíveis realizados entre DPNs 35 a 43, com intervalo de 1 dia entre cada evento estressor: DPN35 - Imobilização, DPN37 – Choque no pé, DPN39 – Nado forçado, DPN41 – Privação de água e DPN43 - Imobilização (**item 4.4**). Esse período é compatível à idade de 12 a 18 anos em seres humanos (SEMPLE et al., 2013) e é particularmente crítico em relação à associação entre exposição a experiências traumatizantes e doenças subsequentes relacionadas à psicose na idade adulta (FISHER et al., 2010; JIA et al., 2010), fato que traz uma validade translacional maior ao modelo.

Cobrimo esse período, do DPN30 ao DPN50, foi administrado CAND 0,3 mg/kg por v.o. aos animais que formaram os grupos prevenção: (Poly(I:C) / E+ / CAND) e (Sal / E- / CAND). Os grupos que não receberam o tratamento preventivo com a CAND, foram tratados com água no mesmo período. Tendo em vista que o tratamento com a CAND foi realizado com propósito de avaliar sua ação preventiva no transtorno, não foi testada nenhuma droga antipsicótica, já que estas atuam apenas quando o distúrbio já está manifestado, não tendo efetividade no pródromo. Os animais do grupo controle (Sal / E-) e (Sal / E- / CAND) não foram submetidos aos eventos estressores (E-).

As avaliações comportamentais dos animais foram realizadas no PN70 (idade adulta). Seguindo as determinações comportamentais, os camundongos foram eutanasiados por decapitação para os ensaios neuroquímicos, sendo o sague coletado por punção retro orbital e hipocampo dissecado, ambos rapidamente congelados e armazenados a -70 ° C até os ensaios.

Os ensaios neuroquímicos foram realizados no plasma (marcadores de estresse oxidativo) e no hipocampo (marcadores de estresse oxidativo, citocinas e expressão protéica).

Em nosso estudo a área cerebral utilizada foi o hipocampo por ser uma estrutura do lóbulo temporal medial de mamíferos implicada no controle da emoção e na formação de memórias episódicas e espaciais (KANDEL, 2012). Ademais, pacientes com esquizofrenia apresentam alterações estruturais e funcionais nesta área, incluindo mudanças nos receptores de neurotransmissores, redução no volume hipocampal e alteração nas conexões sinápticas (HARRISON, 2004).

#### **4.4 Estímulos estressores (GIOVANOLI et al., 2013b)**

O estresse no período da adolescência inicial foi induzido nos grupos Poly (I:C) / E+ e Poly (I:C) / E+ / CAND através dos cinco eventos estressores descritos a seguir:

DPN35: Imobilização: Os camundongos foram mantidos em tubos de plástico foscos individuais (diâmetro: 6 cm, comprimento: 13 cm) por 45 min. Os tubos contensores tinham furos (2 mm de diâmetro), de modo a facilitar o fornecimento de oxigênio. Os animais foram imediatamente devolvidos para suas gaiolas ao final do procedimento.

DPN37: Choque no pé: Os camundongos sofreram 3 estímulos de choques de intensidade de 3mA durante 1 segundo, separados por 3 minutos de descanso, no aparelho de Esquiva Passiva (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP- 104-MC). A sessão termina com um período de adicional de 3 minutos, no qual não há estímulo de choque.

DPN39: Privação de água: Os animais foram submetidos a privação de água durante 16 horas. Para isso, no 39º as garrafas de água foram retiradas as 16:00 horas e repostas as 8:00 horas do 40º dia do protocolo. Os animais tiveram livre acesso à comida durante todo o período de privação de água.

DPN41: Nado forçado: Os animais foram submetidos a duas sessões de nado forçado, cada uma com duração de 1 minutos. Para isso, eles foram colocados individualmente em cilindros de acrílico (50 cm de altura, 18 cm de diâmetro) contendo 30 centímetros de profundidade de água a temperatura ambiente. As sessões foram separadas por um intervalo de 3 minutos. Terminadas as sessões, os camundongos foram secos com uma toalha e imediatamente levados de volta para suas gaiolas.

DPN43: Imobilização: Os animais sofreram o mesmo estímulo estressor aplicado no dia 35.

## 4.5 Determinações comportamentais

Anteriormente à realização dos testes comportamentos os animais foram transportados cuidadosamente até a sala do teste para uma prévia ambientação. Todos os testes foram realizados entre 09:00 e 17:00 horas em salas com iluminação atenuada. No período de intervalo entre o teste de cada animal, os aparatos foram limpos com álcool etílico 10% para prevenir o viés de pistas olfatórias deixadas pelos outros animais.

### 4.5.1 Inibição Pré-pulso (IPP)

O reflexo de sobressalto é uma resposta involuntária primitiva e protetora do corpo a um estímulo acústico intenso e inesperado. A reação envolve uma ativação de músculos esqueléticos e faciais que ocorre dentro de poucos milissegundos, acarretando em uma recuo do corpo inteiro em roedores (DAVIS, 1984). A Inibição Pré-Pulso (IPP) é caracterizada pela redução do reflexo de sobressalto a um estímulo acústico intenso (pulso), quando imediatamente precedido por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso) (Fig. 3) (HOFFMAN; ISON, 1980a; SWERDLOW et al., 2008). Visto isso, o teste de IPP foi aplicado para determinar déficits no filtro sensorio motor, um endofenótipo da esquizofrenia (TURETSKY et al., 2007).

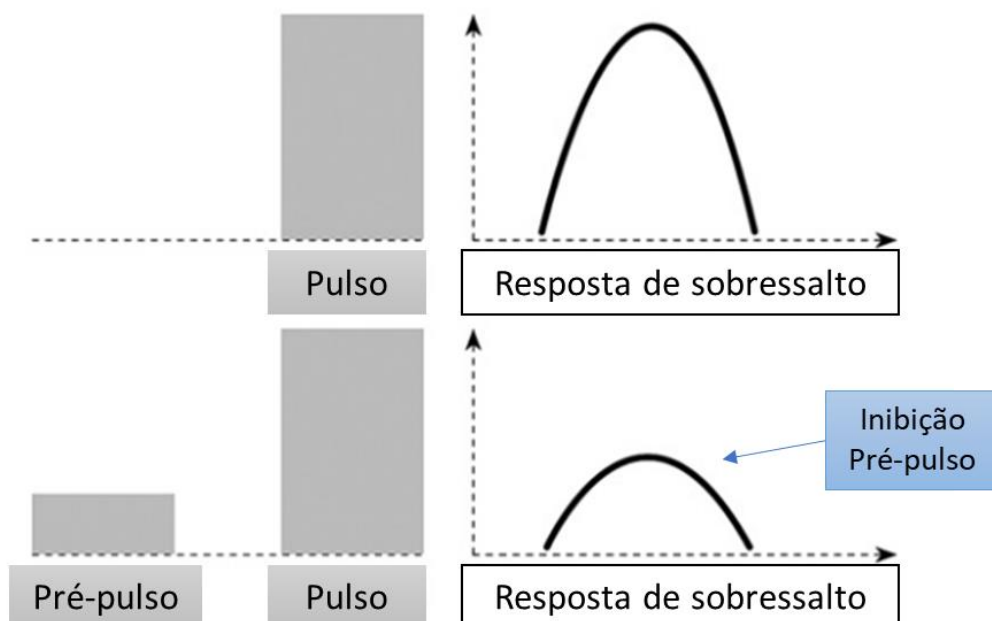


Fig. 3. Inibição pré-pulso (IPP) é a diminuição da resposta de sobressalto quando o estímulo de sobressalto eliciador, o pulso, é precedido por um estímulo sensorial mais fraco, o pré-pulso. Fonte: Adaptado de (KOHL et al., 2013).



No presente estudo, a reação corporal dos animais a um estímulo acústico foi monitorada em uma câmara (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP-175) montada em uma caixa fechada ventilada. Para isso, os camundongos foram colocados em um contensor (4,5 × 5,0 × 5,5 cm) consistido de barras de aço inoxidável de 3,0 mm de diâmetro com espaçamento de 0,8 centímetros de distância. O contensor foi mantido preso sobre uma balança, chamada de plataforma de resposta, através de quatro pequenos parafusos. Um alto-falante localizado a 15 cm do contensor foi utilizado para fornecer os estímulos de pulso, pré-pulso e ruído de fundo. O contensor, a plataforma e o alto-falante são localizados dentro de uma câmara acústica ventilada (64 × 60 × 40 cm). Procedimentos de calibração foram realizados antes dos experimentos para garantir sensibilidades equivalentes das plataformas de resposta ao longo do período de teste (Fig. 4).

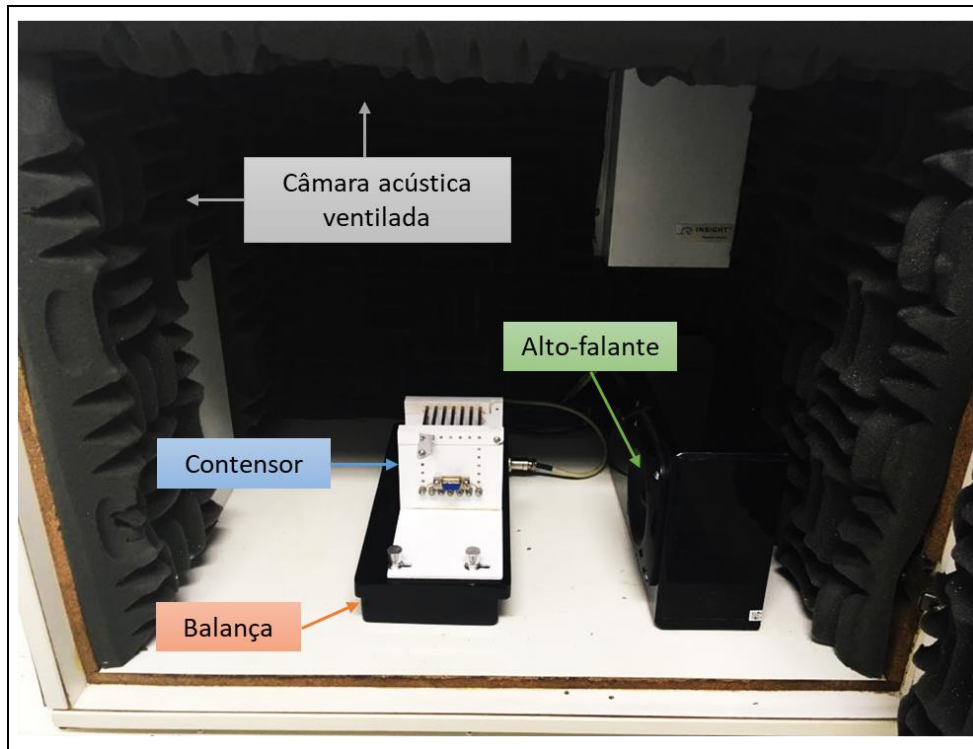


Fig. 4. Representação real do aparelho para teste de inibição pré-pulso.

A sessão de testes começou ao colocar um animal no contensor para a aclimação, este procedimento consistiu em uma exposição de 5 minutos ao ruído de fundo (65 dB). Após o período de aclimação os camundongos foram apresentados a uma série de 10 estímulos de treino (pulso sozinho - 120 dB, 50 ms de duração), com um ensaio de inter-intervalo de 20s. O objetivo desta fase foi permitir a habituação da resposta de sobressalto do animal. Posteriormente, a modulação IPP de sobressalto foi testada no seguinte protocolo: 74 ensaios

pseudorandomizados dividido em oito categorias diferentes, apresentados com um intervalo inter-estímulos de 20s: 20 apresentações de pulso sozinho (120 dB, 50 ms de duração), 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulso sozinho (70, 75 e 80 dB, frequência 3000 Hz, 20 ms de duração), 10 apresentações de cada intensidade de pré-pulso + intensidade de pulso (com intervalo de 50ms entre pré-pulso e pulso) e ausência de estímulo, nesse bloco o animal só recebe o estímulo de ruído de fundo (LEVIN et al., 2011). São utilizadas três intensidades de pré-pulso diferentes para que o teste tenha maior veracidade, como se o mesmo fosse feito em triplicata.

A média da amplitude de resposta de sobressalto aos ensaios de pulso sozinho (P) e pré-pulso + pulso (PP + P) foi calculada para cada animal. O nível de IPP em cada camundongo foi definido como a porcentagem da redução da amplitude do sobressalto nos ensaios de PP + P em comparação com a amplitude do sobressalto nos ensaios de P, de acordo com a seguinte fórmula:  $\% \text{ PPI} = 100 - [100 \times (\text{PP} + \text{P} / \text{P})]$ . Usando esta fórmula, um valor de IPP de 0% denota que não houve diferença entre a amplitude da resposta de sobressalto do pulso sozinho e do pré-pulso + pulso, conseqüentemente, não houve IPP (LEVIN et al., 2011).

Esperou-se que os grupos submetidos ao modelo neurodesenvolvimental dos dois desafios apresentassem déficits de IPP neste teste comportamental e que os animais tratados com a Candesartana não apresentassem alterações neste parâmetro.

#### 4.5.2 Campo Aberto

A atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto (ARCHER, 1973). Este teste foi realizado em um campo (30 cm × 30 cm x 15 cm), dividido em nove partes iguais. Como mostrado na Fig. 5, o software Panlab SMART video tracking system 3.0 foi utilizado para gravar e avaliar o movimento dos camundongos. Para isto, a câmera do software foi anexada a um suporte elevado acima do aparato, a uma distância que permitisse a visualização completa do aparato do teste de campo aberto. Seguindo as instruções do fabricante, nove zonas foram delimitadas virtualmente para que o número de zonas cruzadas (com as quatro patas) fossem registrados. Assim, os animais foram colocados no centro do campo e foi permitido que eles explorassem livremente o cenário por 1 minuto (período de habituação) seguidos de mais 5 minutos (período do teste) (ARCHER, 1973) (Fig. 5).

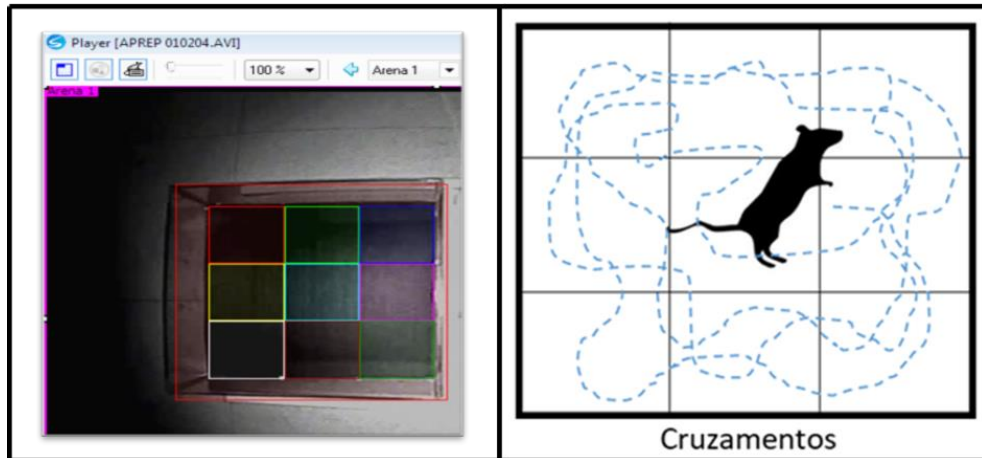


Fig 5: Avaliação da Atividade Locomotora através do software SMART (Fonte: Do próprio autor).

#### 4.5.3 Preferência Social

Os comportamentos de interações sociais são componentes adaptativos e fundamentais da biologia de várias espécies de animais. O reconhecimento social de animais da mesma espécie é importante para manutenção da hierarquia social e escolha de parceiros para o acasalamento. O prejuízo na sociabilidade e reconhecimento social está presente em uma variedade de transtornos neuropsiquiátricos como, por exemplo, a esquizofrenia (WILSON; KOENIG, 2014).

O teste de interação social é caracterizado por um paradigma padrão para estudar o comportamento social geral, além de ser uma ferramenta valiosa nos testes de *screening* de substâncias ansiolíticas e antipsicóticas (SAMS-DODD, 1995). O aparato do teste consiste em uma caixa de acrílico  $60 \times 40$  cm dividida em três câmaras. Como representado na figura 6, os animais testados foram alocados no compartimento central do aparato, podendo explorar livremente as outras câmaras através de uma pequena abertura ( $6 \times 6$  cm) nos divisores. Nas câmaras das extremidades havia uma gaiola de ferro, uma com um animal desconhecido e do mesmo sexo (câmara social) e outra vazia (câmara oposta) (Fig. 6). Os animais testes foram colocados na câmara central, cada um teve um tempo de 5 min de exploração na caixa (RADYUSHKIN et al., 2009). Foi medido o tempo que o animal passou em cada uma das três câmaras e a porcentagem de interação social foi definida como: (porcentagem de tempo gasto na câmara social) – (porcentagem de tempo gasto na câmara oposta).

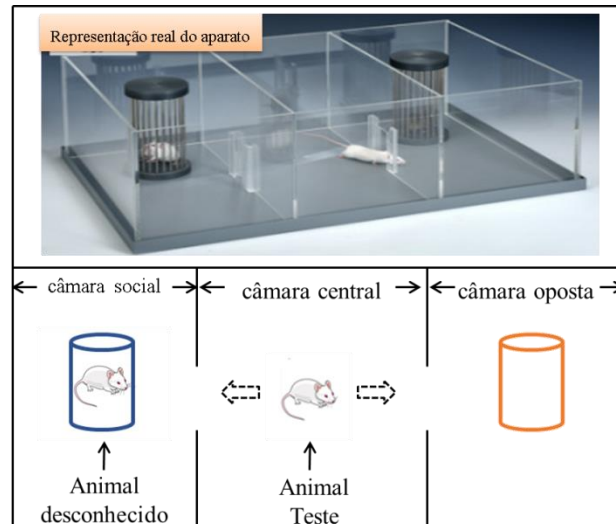


Fig 6. Protótipo e aparato utilizado para o teste de Interação Social (Fonte: Do próprio autor).

#### 4.5.4 Labirinto em Y

A memória de trabalho foi avaliada por meio de um teste de Labirinto em Y, que permite avaliar o comportamento cognitivo exploratório através da percepção do desempenho de alternância espontânea (MAURICE; LOCKHART; PRIVAT, 1996). O labirinto consiste em 3 braços idênticos de 40 cm de comprimento, 25 cm de altura e 6 cm de largura cada convergindo a um ângulo igual de 120° (Fig. 7). Cada camundongo foi colocado na extremidade de um braço e deixado para explorar o ambiente por 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado (exemplo de alternância correta: braços 1,2,3 ou 3,1,2; exemplo de alternância incorreta: 1,2,1 ou 3,1,3). Assim, a percentagem das alternâncias corretas foi calculada como a razão entre as alternâncias corretas ( $n$ ) e o número de visitas realizadas durante o período de observação ( $n-2$ ), multiplicado por 100 (DALL'IGNA et al., 2007; YAMADA et al., 1996).

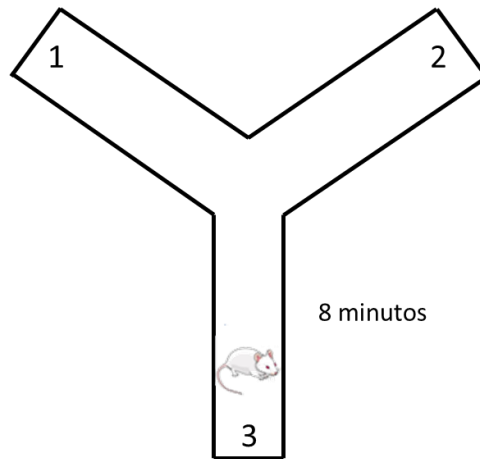


Fig. 7: Teste do Labirinto em Y (Fonte: Do próprio autor).

## 4.6 Determinações biomoleculares e neuroquímicas

### 4.6.1 Expressão proteica de AT1R e NFκB

A quantificação da expressão proteica hipocampal do Receptor de angiotensina II Tipo 1 (AT1R) e NFκB foi avaliada através da técnica de Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

#### 4.6.1.1 Extração de proteínas

O hipocampo foi macerado com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 200 µl de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

#### 4.6.1.2 Método Bradford para dosagem de proteínas

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ligação à proteína ocorre quando a absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 160 µL de amostra

e 40 µL de solução de Bradford nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,2 a 1,0 mg / mL.

#### **4.6.1.3 Western Blotting**

Inicialmente, preparou-se 50 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 segundos, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% para todas as proteínas, com exceção do gel para determinação de NR2B que foi de 7%, e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 V por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as diferentes membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos primários Anti-AT1R (1:1000; Abcam, USA), anti-NFκB (1:1000; Sigma, USA) e rat anti-α-tubulin IgG primary antibody (1:4000; Sigma, USA) diluídos em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:1000; Sigma, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 10 min cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ImageQuant 300 Imager (GE 75 Healthcare, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

#### 4.6.2 Determinações inflamatórias (IL4, IL1 $\beta$ e TNF $\alpha$ )

Inicialmente, as amostras de hipocampo foram homogeneizadas a 8x em tampão PBS com inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA), centrifugadas a 13000 RPM durante 10 minutos. O sobrenadante do hipocampo foi utilizado para determinar a concentração das citocinas IL4, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Foi utilizado um kit comercial de Elisa (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) referênte ao tipo de citocina e o experimento foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante e as concentrações expressas em pg / g de tecido.

#### 4.6.3 Determinações do estresse oxidativo

Muitos estudos mostram o estresse oxidativo como um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia (EMILIANI; SEDLAK; SAWA, 2014; HUANG; LIU, 2017). Visto isso, amostras de plasma sem diluição, obtidos após centrifugação (3.500 rpm/15 minutos) das amostras de sangue coletado de cada animal; e amostras de hipocampo após homogeneização com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, foram utilizadas para avaliar os seguintes ensaios de estresse oxidativo:

##### 4.6.3.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada através da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: *thiobarbituric acid reactive substances -TBARS*) nos homogenatos de hipocampo e no plasma de cada camundongo como uma medida de produção de espécies reativas de oxigênio (DRAPER et al., 1993). Inicialmente, 63 $\mu$ L do plasma e do homogenato do hipocampo foram misturado a 100  $\mu$ L de ácido perclórico 35% e centrifugadas (7000 rpm/15 min). Após este passo, 150  $\mu$ L dos sobrenadantes foram recuperados e misturados com 50  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorbância a 535 nm e foi expressa como mcg de MDA / g de tecido úmido, para amostras de hipocampo e microg de MDA / mL, para amostras de plasma (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

##### 4.6.3.2 Nitrito

Para avaliar alterações na produção de óxido nítrico (NO), foram determinados níveis de nitrito em homogenatos dos hipocampos e plasma dos animais com base na reação de Griess

(GREEN; GOLDMAN, 1981; RADENOVIC; SELAKOVIC, 2005). Para esse experimento 100  $\mu$ L do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% / cloridrato de N-(1-naftil)- etilenediamina 0.1% / ácido fosfórico a 5% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100  $\mu$ L das amostras estudadas (plasma e homogenato hipocampal) e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com varias concentrações de NaNO<sub>2</sub> (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições e os brancos foram preparados pela adição de 100  $\mu$ L do reativo de Griess a 100  $\mu$ L do tampão usado para o homogenato. A absorbância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm e foi expressa em nM de nitrito / g de tecido úmido, para amostras de hipocampo e mcg/mL, para amostras de plasma.

#### **4.7 Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média utilizando o *software* SPSS (Versão 23 para Windows). Os resultados foram analisados por ANOVA de três vias seguida por análise de *post hoc* de comparações múltiplas utilizando o teste de Bonferroni para explorar as interações significativas e revelar as diferenças específicas entre os grupos. Os fatores utilizados para estas análises foram "sexo" (macho X fêmea), "dois desafios" (tratamento neonatal com poly (I:C) e exposição ao estresse na adolescência X sem desafio imune neonatal e sem estresse na adolescência) e "Tratamento" (salina X Candesartana). Ademais, a análise dos resultados de expressão protéica foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Fisher's LSD. Para análise dos resultados do teste de IPP foi realizada uma média entre as IPPs das três intensidades de decibéis que cada animal foi exposto. O nível de significância foi definido em  $P \leq 0.05$ .



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resultados das alterações comportamentais

O teste de inibição pré-pulso foi usado para avaliar a função sensório-motor atencional (BRAFF; LIGHT, 2005). O resultado de sobressalto para cada pré-pulso analisado foi calculado através de uma média entre as três intensidades. A análise da média de sobressalto nas três intensidades de pré-pulso (Fig. 8) revelou uma interação significativa entre os fatores “tratamento” e “dois desafios” [ $F(1, 104) = 62,768; P < 0,0001$ ] sem interação significativa entre os três fatores. Tanto os machos quanto as fêmeas quando submetidos ao modelo de dois desafios apresentaram déficits de IPP quando comparados com o grupo controle (não expostos aos dois desafios) (machos e fêmeas:  $P < 0,0001$ ). O tratamento com candesartana preveniu os déficits de IPP tanto nos machos quanto nas fêmeas (machos e fêmeas:  $P < 0,0001$ ).

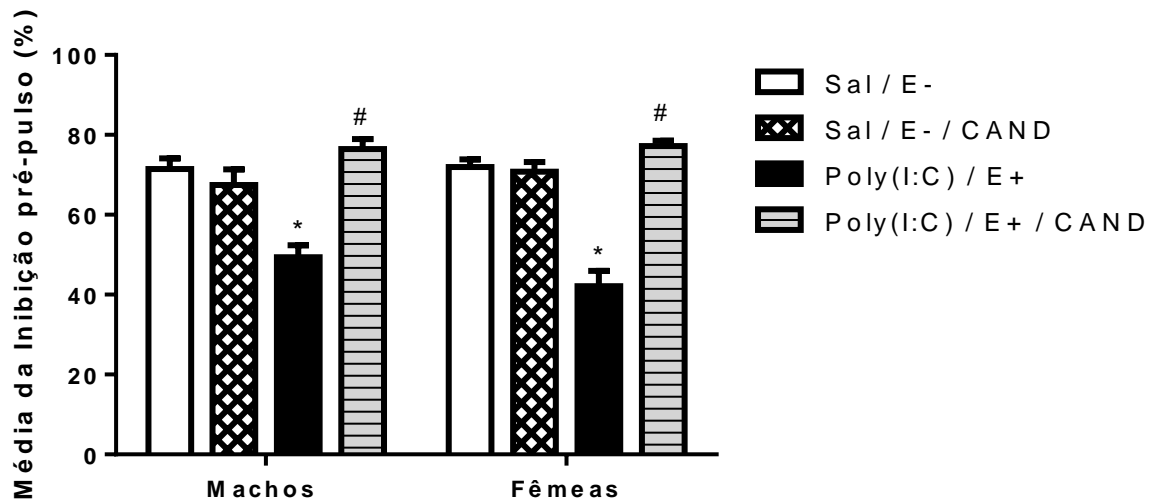


Fig. 8. Efeito da CAND na média da % de IPP de camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (SEM) (n=08-19 animais/grupo). \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle; #P <0,05 quando comparado com grupo modelo (“dois desafios”). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de três vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: Sal = salina; CAND = candesartana; E<sup>+</sup>: expostos ao estresse; E<sup>-</sup>: não expostos ao estresse.

No que concerne ao teste de campo aberto, o parâmetro de atividade locomotora foi mensurado pelo número de cruzamentos (Fig. 9A). Foi verificada uma significativa interação entre dois fatores: “tratamento” e “dois desafios” [ $F(1, 91) = 22,685$ ;  $P < 0,0001$ ] sem interação entre os três fatores. Tanto os animais machos e fêmeas apresentaram um aumento no número de cruzamentos quando expostos aos dois desafios (machos:  $P = 0,001$ ; fêmeas:  $P < 0,0001$ ) em comparação aos animais não expostos aos desafios (animais controle). O tratamento com CAND diminuiu o número de cruzamentos quando comparado com os animais submetidos ao modelo sem tratamento (machos e fêmeas:  $P < 0,0001$ ). São demonstrados também as trajetórias representativas de cada grupo obtidas através do *software* Panlab SMART video tracking system 3.0 (Fig. 9B).

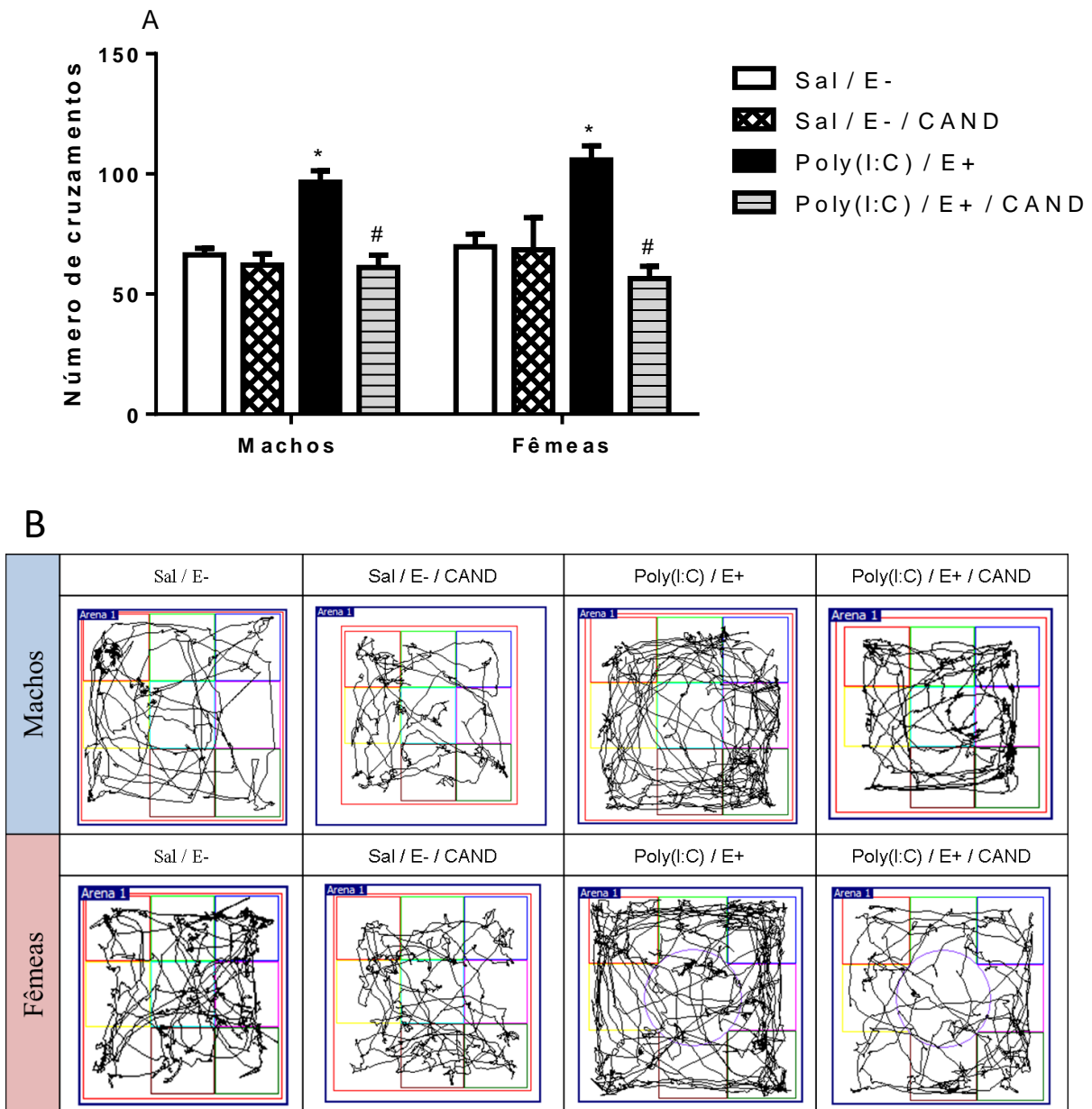


Fig. 9. Efeito da CAND no número total de cruzamentos percorridos pelos animais machos e fêmeas submetidos ao modelo de “dois desafios” [poly(I:C) + E+] (A) e suas respectivas trajetórias representativas (B). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=05-15 animais/grupo). \*P < 0,05 quando comparado com o grupo controle; #P < 0,05 quando comparado com grupo modelo (“dois desafios”). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de três vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: Sal = salina; CAND = candesartana; E<sup>+</sup>: expostos ao estresse; E<sup>-</sup>: não expostos ao estresse.

Tendo em consideração o comportamento de sociabilidade ou interação social (Fig. 10A), a análise estatística revelou uma significativa interação de duas vias entre os fatores “tratamento” e “dois desafios” [ $F(1, 109) = 63,587$ ;  $P < 0,0001$ ] sem interação entre os três fatores. A exposição ao modelo de dois desafios reduziu drasticamente a interação social quando comparados aos animais sem desafios, tanto nos machos quanto nas fêmeas (machos e fêmeas:  $P < 0,0001$ ). Por outro lado, o tratamento com CAND preveniu os déficits na sociabilidade induzidos pelo modelo de dois desafios, tanto nas fêmeas quanto nos machos, quando comparado aos animais expostos aos desafios e tratados com salina (fêmeas e machos:  $P < 0,0001$ ).

Em relação à memória de trabalho avaliada pela porcentagem de alterações corretas no teste de Labirinto em Y (Fig. 10B), a análise univariada revelou uma interação significativa de duas vias entre os fatores “tratamento” e “dois desafios” [ $F(1, 76) = 45,464$ ;  $P < 0,0001$ ]. O modelo de dois desafios reduziu a porcentagem de alterações corretas tanto nos animais machos quanto nas fêmeas quando comparados com os animais controle (machos e fêmeas:  $P < 0,0001$ ). O tratamento com CAND preveniu o déficit na memória de trabalho induzido pela exposição aos dois desafios quando comparados aos animais apenas expostos ao modelo tratados com salina (machos e fêmeas:  $P < 0,0001$ ).

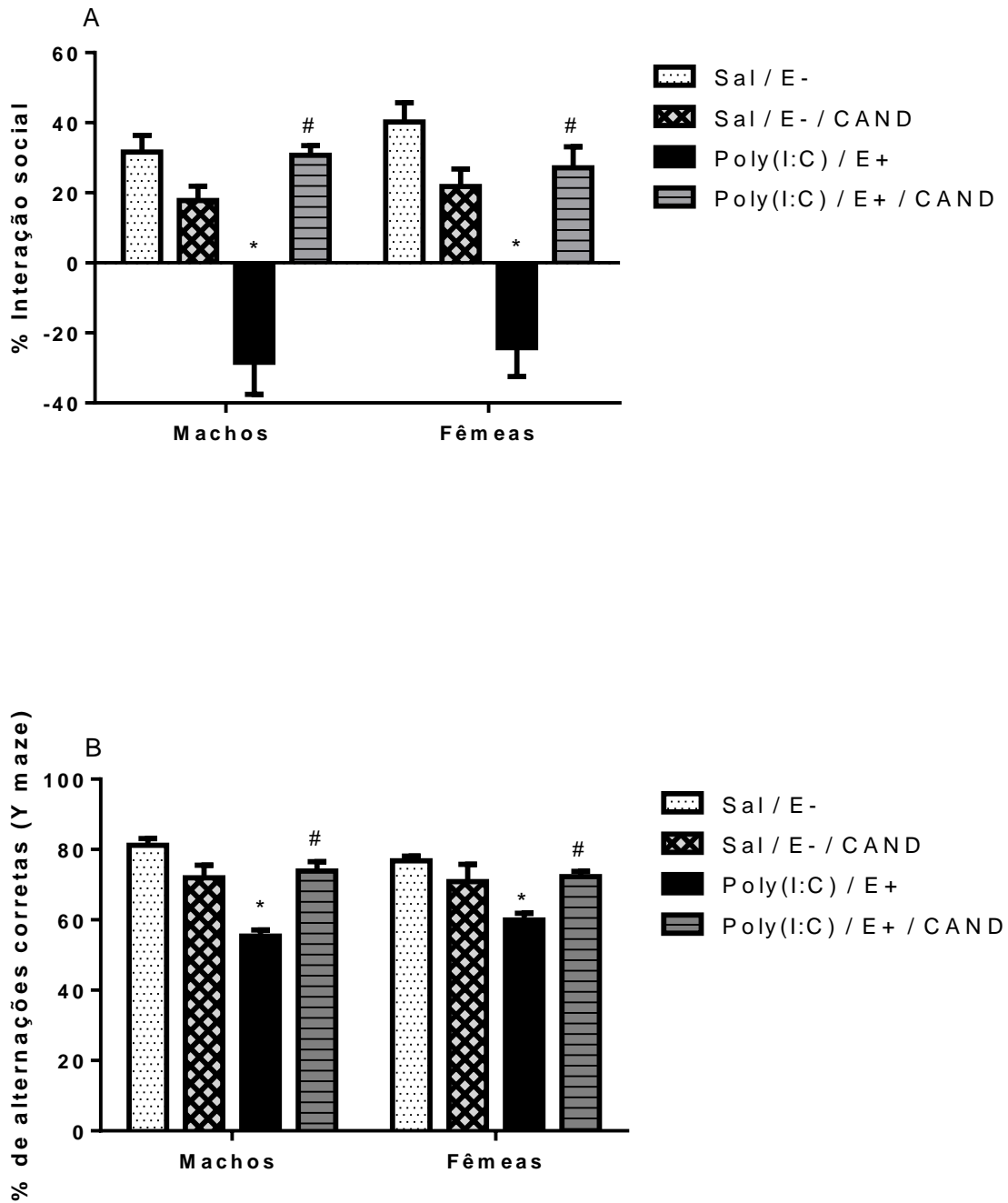


Fig. 10. Efeito da CAND na Interação social (A) e na % de Alterações corretas (B) em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios [poly(I:C) + E+]. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=06-15 animais/grupo). \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle; #P <0,05 quando comparado com grupo modelo (“dois desafios”). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de três vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: Sal = salina; CAND = candesartana; E<sup>+</sup>: expostos ao estresse; E<sup>-</sup>: não expostos ao estresse.

## **5.2 Resultados da avaliação da expressão proteica do receptor AT1**

Na avaliação da expressão hipocampal do receptor AT1 não houve interação entre os fatores [ $F(1, 14) = 2,32$ ;  $P = 0.1499$ ], entretanto verificou-se um aumento significativo na expressão de AT1 nos animais machos submetidos aos dois desafios ( $P = 0.0096$ ) quando comparado aos animais machos tratados com salina. Foi observado também uma diminuição de expressão de AT1 quando os machos foram expostos aos dois desafios foram tratados com CAND ( $P = 0.0219$ ) Enquanto que as fêmeas submetidas aos dois desafios apresentam um maior nível de expressão relativa de AT1 quando em comparação com os machos expostos aos desafios ( $P = 0.0026$ ) (Fig. 11A).

## **5.3 Resultados da avaliação da expressão proteica de NF- $\kappa$ B**

Na avaliação da expressão hipocampal do fator de transcrição NF- $\kappa$ B não houve interação significativa entre os fatores avaliados [ $F(2, 19) = 1.774$ ;  $P = 0.1966$ ]. Contudo, foi possível verificar um aumento da expressão relativa desse fator em machos submetidos ao modelo de dois desafios quando comparados aos machos controle ( $P = 0.0275$ ). Observou-se também uma diminuição na expressão de NF- $\kappa$ B quando os machos expostos aos dois desafios foram tratados com CAND ( $P = 0.0161$ ). Além disso, as fêmeas submetidas aos dois desafios apresentaram menor expressão relativa desse fator quando comparadas com os machos submetidos aos mesmos desafios ( $P = 0.0126$ ). (Fig. 11B)

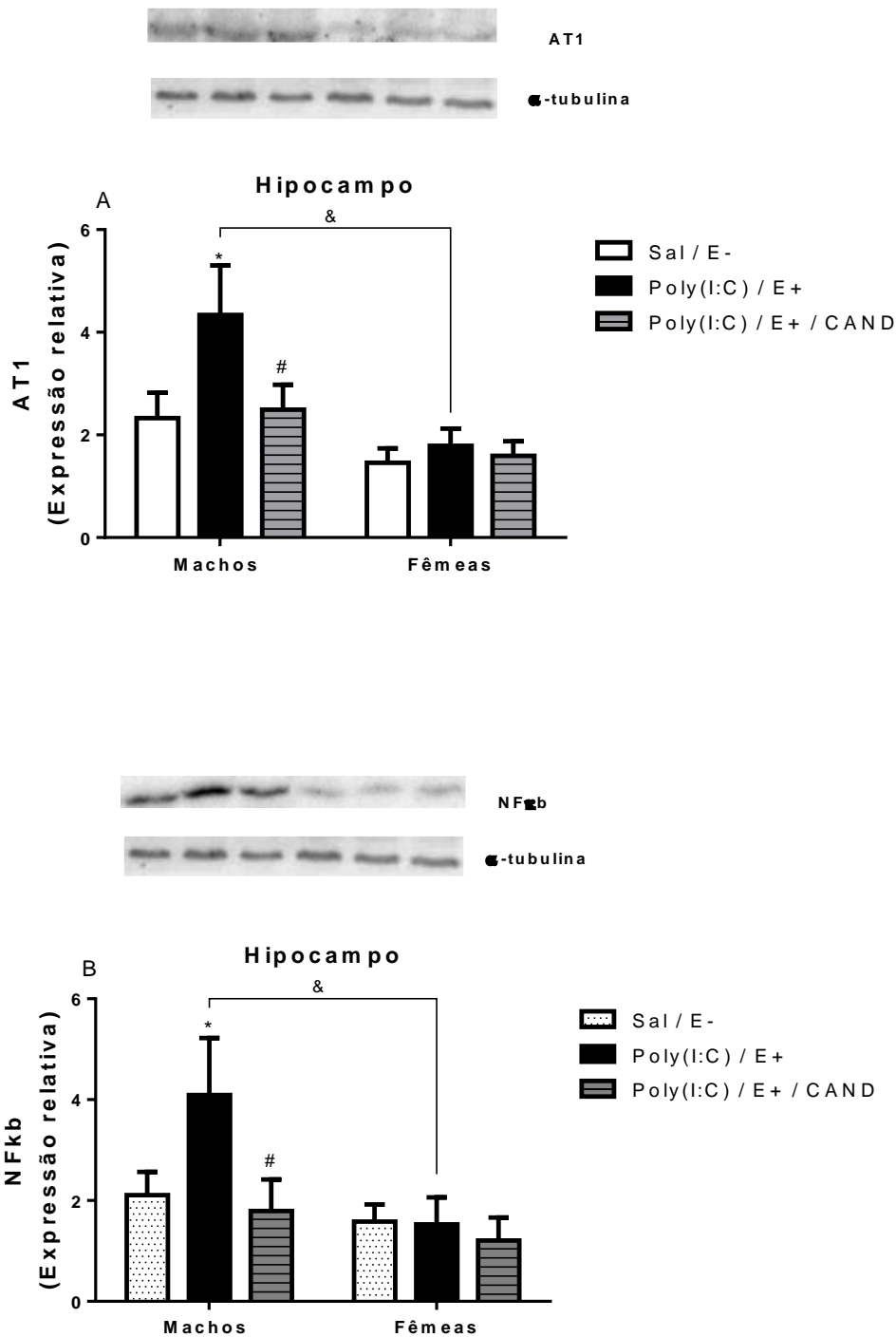


Fig. 11. Efeito da CAND na expressão proteica de AT1 (A) e NF- $\kappa$ B (B) avaliada no hipocampo de camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios [poly(I:C) + E+]. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=4-5 animais/grupo). \*P < 0,05 quando comparado com o grupo controle; #P < 0,05 quando comparado com grupo modelo (“dois desafios”); &P < 0,05 em relação aos dois sexos. A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Fisher's LSD. Abreviações: Sal = salina; CAND = candesartana; DPN = dia pós-natal; E<sup>+</sup>: expostos ao estresse; E<sup>-</sup>: não expostos ao estresse.



#### 5.4 Resultado das alterações nos níveis de citocinas no hipocampo

A análise dos níveis de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) no hipocampo revelou uma interação significativa de duas vias entre os fatores “sexo” e “tratamento” [F(1, 51) = 47,410; P<0,0001] e entre os fatores “sexo” e “dois desafios” [F(1, 51) = 41,802; P<0,0001] sem interação significativa entre os três fatores (Fig. 12A). Apenas os animais machos expostos aos dois desafios apresentaram um aumento nos níveis hipocampais de IL-1 $\beta$  quando comparados aos animais sem desafios (P<0,0001). O tratamento com CAND reduziu os níveis de IL-1  $\beta$  no hipocampo nos animais machos e fêmeas submetidos aos dois desafios (fêmeas: P<0,041; machos: P<0,0001).

Em relação aos níveis de interleucina 4 (IL-4) no hipocampo (Fig. 12B). A análise revelou significantes interações de duas vias entre os fatores: “tratamento” e “sexo” [F(1, 49) = 88,086; P<0,0001]; “sexo” e “dois desafios” [F(1, 49) = 104,205; P<0,0001]; e “tratamento” e “dois desafios” [F(1, 49) = 13,802; P = 0,001] sem interação entre os três fatores. Enquanto os animais machos quando expostos aos dois desafios apresentaram níveis elevados de IL-4 no hipocampo, as fêmeas apresentaram níveis diminuídos dessa mesma citocina (machos e fêmeas: P<0,0001). Por outro lado, o tratamento com CAND reduziu os níveis de IL-4 no hipocampo dos animais expostos aos dois desafios, tanto nos machos quanto nas fêmeas (machos e fêmeas: P<0,0001). Além disso é importante destacar que os animais machos sem desafios tratados com salina (controle) apresentaram níveis menores de IL-4 em comparação as fêmeas do grupo controle (P<0,0001).

Tendo em consideração os níveis hipocampais de TNF- $\alpha$  (Fig. 12C), a análise univariada revelou um significativo interação de duas vias entre os fatores: “tratamento” e “sexo” [F(1, 40) = 58,639; P<0,0001]; e “sexo” e “dois desafios” [F(1, 40) = 74,202; P<0,0001]. Os animais machos expostos aos dois desafios apresentaram níveis aumentados de TNF- $\alpha$ , enquanto as fêmeas expostas aos desafios apresentaram níveis diminuídos quando comparados aos animais sem exposição aos desafios (fêmeas: P = 0,015; machos: P<0,0001). O tratamento com CAND foi capaz de diminuir os níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo dos animais submetidos ao modelo, tanto nos machos quanto fêmeas (machos: P<0,0001; fêmeas: P = 0,041).

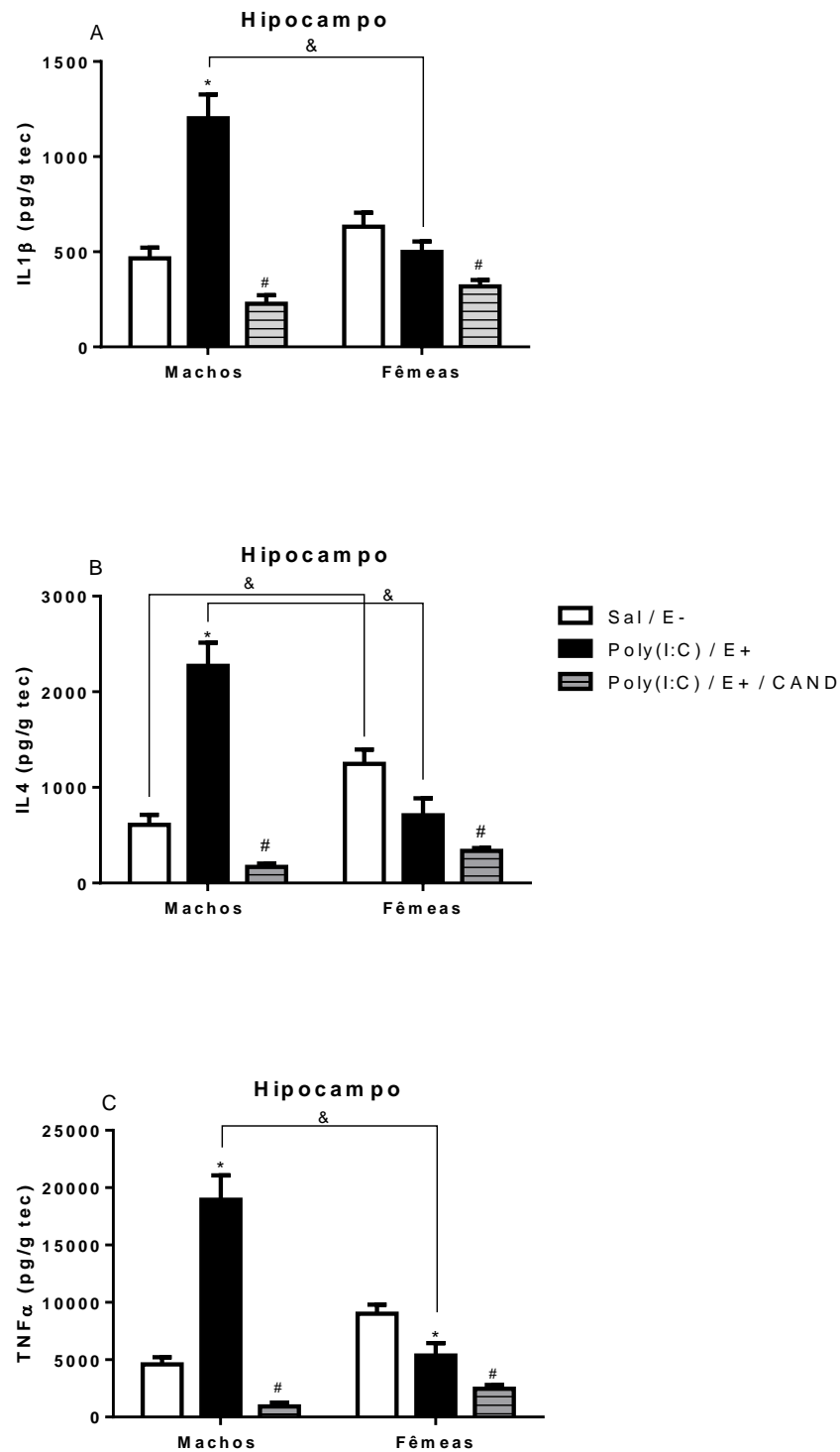


Fig. 12. Efeito da CAND nos níveis hipocâmpais de IL-1 $\beta$  (A), IL-4 (B) e TNF- $\alpha$  (C) em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios [poly(I:C) + E+]. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=06-15 animais/grupo). \*P < 0,05 quando comparado com o grupo controle; #P < 0,05 quando comparado com grupo modelo ("dois desafios"); &P < 0,05 em relação aos dois sexos. A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de três vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: Sal = salina; CAND = candesartana; E<sup>+</sup>: expostos ao estresse; E<sup>-</sup>: não expostos ao estresse.

## 5.5 Resultados das alterações oxidativas e nitrosativas

### 5.5.1 Alterações na região cerebral do hipocampo

A análise dos níveis de malondialdeído (MDA) no hipocampo revelou interações significantes de duas vias entre os fatores: “tratamento” e “sexo” [ $F(1, 60) = 10,516; P = 0,002$ ]; “tratamento” e “dois desafios” [ $F(1, 60) = 13,450; P = 0,001$ ] com interação entre os três fatores, “tratamento”, “sexo e “dois desafios” [ $F(1, 60) = 19,808; P < 0,0001$ ] (Fig. 13A). A exposição aos dois desafios aumentou os níveis de malondialdeído apenas nos animais machos quando comparados aos animais controle (sem desafios) (machos:  $P < 0,0001$ ; fêmeas:  $P = 0,137$ ). O tratamento com CAND diminuiu os níveis de MDA nos animais machos submetidos ao modelo, enquanto que nas fêmeas o tratamento com CAND aumentou os níveis de MDA em comparação aos animais submetidos ao modelo tratados com salina (machos:  $P = 0,016$ ; fêmeas:  $P < 0,0001$ ). Nesta área cerebral, os níveis do produto de peroxidação lipídica foi menor em fêmeas expostas aos dois desafios em comparação aos machos ( $P < 0,0001$ ).

No tocante aos níveis de nitrito/nitrato no hipocampo foi possível observar uma significativa interação entre “tratamento” e “dois desafios” [ $F(1, 56) = 12,87; P = 0,001$ ] sem interação entre os três fatores. A exposição aos dois desafios aumentou os níveis de nitrito/nitrato em comparação aos animais não expostos, tanto machos quanto fêmeas (machos e fêmeas:  $P < 0,0001$ ). O tratamento com CAND foi capaz de prevenir as alterações nos níveis de metabólitos nitrosativos induzidas pelo modelo apenas nas fêmeas ( $P = 0,001$ ) (Fig. 13B).

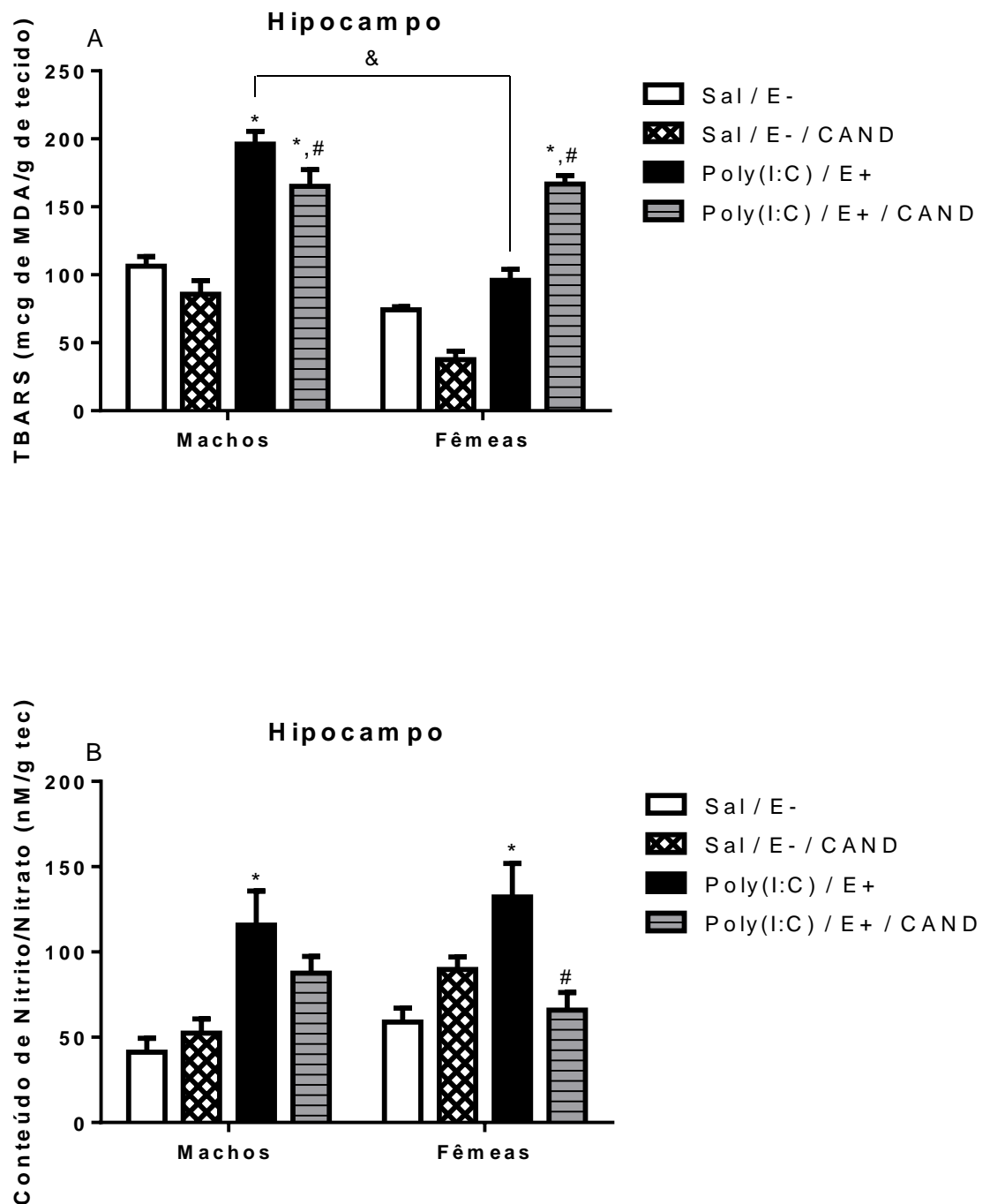


Fig. 13. Efeito da CAND nos níveis hipocampais de MDA (TBARS) (A) e Conteúdo de nitrito/nitrato (B) em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios (poly(I:C) + E+). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=06-15 animais/grupo). \*P < 0,05 quando comparado com o grupo controle; #P < 0,05 quando comparado com grupo modelo (“dois desafios”); &P < 0,05 em relação aos dois sexos. A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de três vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: Sal = salina; CAND = candesartana; E<sup>+</sup>: expostos ao estresse; E<sup>-</sup>: não expostos ao estresse.

### 5.5.2 Alterações no compartimento plasmático

Com relação aos níveis de um produto da peroxidação lipídica no plasma (malondialdeído – MDA) foi possível verificar uma interação significativa entre os fatores “tratamento” e “dois desafios” [ $F(1, 72) = 14,261$ ;  $P < 0,0001$ ] sem apresentar interação entre os três fatores estudados. Níveis elevados de MDA foram detectados no plasma, tanto nos camundongos machos ( $P < 0,0001$ ) quanto nas fêmeas ( $P < 0,0001$ ), expostos aos dois desafios. O tratamento com CAND reverteu o aumento da peroxidação lipídica induzida pela exposição aos dois desafios em ambos sexos (machos:  $P < 0,0001$  e fêmeas  $P < 0,0001$ ) (Fig. 14A).

Em relação aos níveis de nitrito/nitrato no plasma, duas interações de duas vias foram observadas entre “sexo” e “dois desafios” [ $F(1, 60) = 6,77$ ;  $P = 0,012$ ], “tratamento” e “dois desafios” [ $F(1, 60) = 31,28$ ;  $P < 0,0001$ ] com uma interação significativa entre as três variáveis estudadas [ $F(1, 60) = 13,493$ ;  $P = 0,001$ ]. Níveis elevados de nitrito/nitrato foram detectados no plasma dos camundongos submetidos aos dois desafios, em ambos sexos (machos e fêmeas:  $P < 0,0001$ ). Neste mesmo fluido, o tratamento com CAND reduziu os níveis de nitrito/nitrato nos camundongos machos ( $P = 0,047$ ) e fêmeas ( $P < 0,0001$ ) submetidos ao modelo em comparação aos homólogos tratados com salina. Em contrapartida, as fêmeas sem exposição aos dois desafios e tratadas com CAND apresentaram níveis elevados de nitrito/nitrato em relação ao grupo controle ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 14B).

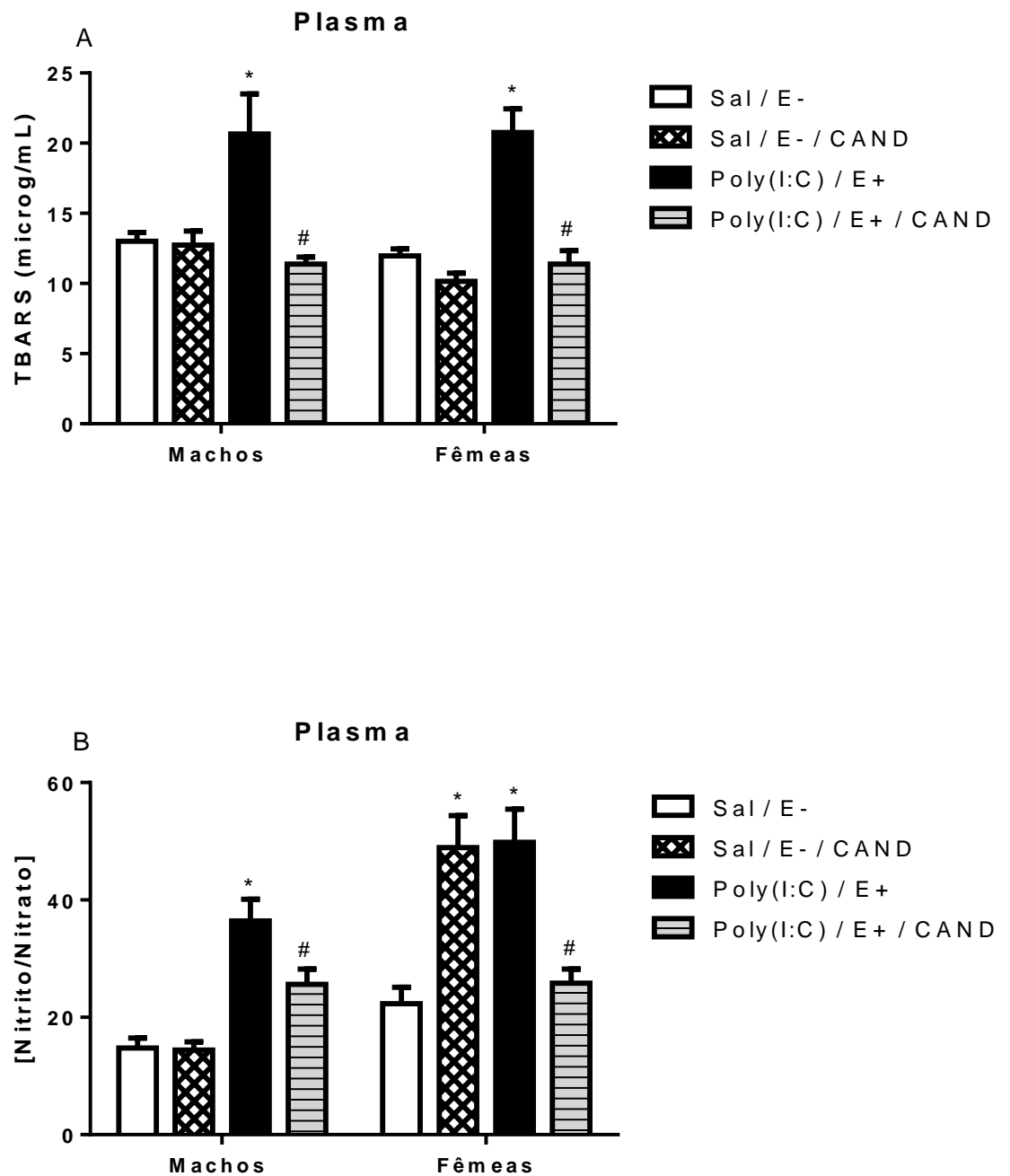


Fig. 14. Efeito da CAND nos níveis plasmáticos de MDA (TARS) (A) e conteúdo de nitrito/nitrato (B) em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios [poly(I:C) + E+]. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=06-15 animais/grupo). \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle; #P <0,05 quando comparado com grupo modelo (“dois desafios”); &P <0,05 em relação aos dois sexos. A análise dos resultados foi feita através da ANOVA de três vias seguida pelo teste de Bonferroni. Abreviações: Sal = salina; CAND = candesartana; E<sup>+</sup>: expostos ao estresse; E<sup>-</sup>: não expostos ao estresse.

## 6. DISCUSSÃO

Em suma, os resultados mostraram que o desafio imune neonatal com poly(I:C), combinado ao estresse na adolescência, provocou alterações comportamentais, oxidativas, nitrosativas e pró-inflamatórias em camundongos machos e fêmeas. Mostraram também que a administração de CAND durante a fase da periadolescência de machos e fêmeas preveniu algumas alterações induzidas pelo modelo de dois desafios.

Mais especificamente, após exposição aos dois desafios, foram observadas alterações como déficits de IPP, hiperlocomoção, prejuízo na sociabilidade e déficits na memória de trabalho, em ambos os sexos. A administração prévia de CAND foi capaz de prevenir todas as alterações comportamentais em ambos os sexos. Além disso, foi revelada uma supra expressão dos receptores AT1 e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no hipocampo dos animais machos submetidos aos dois desafios, sendo a CAND capaz de prevenir a supra-regulação dessas proteínas apenas neste sexo.

Outra avaliação realizada demonstrou o aumento dos níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4 e TNF- $\alpha$  no hipocampo apenas dos animais machos submetidos ao modelo. O tratamento preventivo com a CAND preveniu o aumento desses marcadores inflamatórios nestes animais.

Ocorreram também mudanças oxidativas nos camundongos expostos aos dois desafios, avaliadas tanto no hipocampo quanto no plasma, através do aumento de peroxidação lipídica no hipocampo (nos machos) e no plasma (ambos os sexos). Neste caso, a CAND foi capaz de prevenir o aumento da peroxidação lipídica apenas no plasma em ambos os sexos.

Em relação às mudanças nitrosativas, demonstradas através do aumento dos níveis de nitrito/nitrato tanto no hipocampo quanto no plasma em ambos os sexos, a CAND mostrou-se eficiente em prevenir esse aumento tanto no hipocampo (apenas nas fêmeas) quanto no plasma (ambos os sexos).

### ***Efeito preventivo da Candesartana sobre as alterações comportamentais induzidas pelo modelo de dois desafios em ambos os sexos.***

A exposição à infecção viral pré-natal e a traumas psicológicos na fase peripuberal são dois fatores de risco ambientais envolvidos na etiologia dos transtornos neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia (GIOVANOLI et al., 2013a). O modelo em estudo foi adaptado de tal forma que, o primeiro desafio, a ativação imunológica com poly(I:C), ocorre no período neonatal (5-7 DPN) e o segundo desafio (exposição a fatores micro-estressores) ocorre na adolescência (35-43 DPN). Esse modelo neurodesenvolvimental da esquizofrenia está cada vez

mais em evidência e demonstra ser um importante modelo animal, apresentando validade de face, de constructo e preditiva (JONES et al., 2011).

A validade de face dos sintomas positivos em modelos animais de esquizofrenia é controversa devido às limitações em mimetizar fenômenos exclusivamente humanos, como alucinações auditivas e delírios, em animais. Desta forma, os sintomas positivos em animais são avaliados com base em dois principais tipos de alterações comportamentais: hiperatividade locomotora e déficits de IPP (VAN DEN BUUSE, 2010).

A IPP é caracterizada pela redução do reflexo de sobressalto a um estímulo acústico intenso (pulso), quando imediatamente precedido por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso) (HOFFMAN; ISON, 1980b; SWERDLOW et al., 2008), demonstrando desse modo, o papel do filtro sensorio-motor (GRAHAM, 1975). Pacientes com esquizofrenia tanto homens quanto mulheres apresentam déficits de IPP (BRAFF et al., 2005). Nossos resultados corroboram com esses dados através da redução da IPP nos animais de ambos os sexos submetidos aos dois desafios, mostrando, desta forma, um prejuízo no filtro sensorio-motor destes animais semelhante ao encontrado na clínica dos pacientes com esquizofrenia.

Em concordância, estudos anteriores abordando o modelo de esquizofrenia dos dois desafios, relataram que a combinação de ambos os insultos foi associada a déficits na ativação do filtro sensorio-motor (DESLAURIERS et al., 2013; MONTE et al., 2017a). O déficit de IPP é considerado um endofenótipo para a esquizofrenia (BRAFF et al., 2007) sendo indicativo de um prejuízo no processo antecipatório que impede a sobrecarga sensorial e a fragmentação cognitiva (GEYER; MCILWAIN; PAYLOR, 2002; POWELL; ZHOU; GEYER, 2009; SWERDLOW et al., 1991). Assim, a IPP representa a "interface entre a psicose e a cognição" (DESBONNET; WADDINGTON; O'TUATHAIGH, 2009). Nesse contexto, nossos resultados mostraram que a administração de CAND durante a adolescência e início da fase adulta foi capaz de prevenir os sintomas tipo positivos e cognitivos induzidos pelo modelo dos dois desafios em ambos os sexos, evidenciado pelos déficits de IPP, apontando para uma potencial abordagem no efeito preventivo nesta fase crítica da esquizofrenia.

Déficits de IPP também podem ser induzidos por fármacos que facilitam a atividade dopaminérgica, como *d*-anfetamina (SWERDLOW et al., 1990), bem como por fármacos que ativam diretamente os receptores de dopamina D2 (D2Rs), por exemplo, apomorfina (SWERDLOW; GEYER, 1998). Em um estudo prévio, que utilizou apomorfina como agonista dopaminérgico, o pré-tratamento com captopril, um inibidor da ECA (enzima conversora de angiotensina), causou uma redução no efeito da apomorfina no IPP, similar ao observado nos camundongos *knockout* para ECA (VAN DEN BUUSE et al., 2005). Semelhante ao encontrado



nos nossos resultados com a candesartana, esses dados sugerem um papel importante dos agentes que interferem no SRA na modulação dos mecanismos dopaminérgicos envolvidos no IPP.

Além do déficit da IPP, outra alteração observada nos animais machos e fêmeas submetidos aos dois desafios foi o aumento da atividade locomotora avaliada pelo teste do campo aberto. Juntas, essas duas alterações mimetizam os sintomas tipo esquizofrenia "positivos". Em concordância, achados semelhantes relacionados ao aumento da atividade locomotora também foram observados em dois modelos animais de esquizofrenia: modelo de esquizofrenia induzido pela administração repetida de cetamina (VASCONCELOS et al., 2015a) e em modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzido por "dois desafios" em ratos machos e fêmeas (MONTE et al., 2017a). Embora complexo e multifatorial, o papel da dopamina no controle do movimento já é bem estabelecido sendo o teste para hiperatividade locomotora baseado no conceito de que a atividade dopaminérgica aumentada em roedores leva a uma atividade motora aumentada, frequentemente interpretada como indicativo de comportamento do tipo psicótico (JONES et al., 2011; VAN DEN BUUSE, 2010).

Com relação ao efeito da CAND na atividade locomotora, fêmeas e machos expostos aos dois desafios e tratados com CAND apresentaram uma redução desse parâmetro quando comparados aos animais submetidos aos dois desafios e não tratados, evidenciando que a CAND preveniu a hiperlocomoção nesses animais. Correlacionando com nossos achados, nosso grupo de pesquisa anteriormente demonstrou que a CAND foi capaz de prevenir a hiperlocomoção em camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzida por anfetamina, uma droga capaz de induzir sintomas similares a psicose semelhantes aos da esquizofrenia aguda (BRAMNESS et al., 2012; DE SOUZA GOMES et al., 2015).

Desde que o transtorno esquizofrênico tem sido proposta como uma síndrome clínica (CARPENTER, 2007), seus diferentes domínios, na medida do possível, devem ser abordados na pesquisa pré-clínica. Isso é reforçado pelas necessidades terapêuticas não satisfatórias em relação aos sintomas negativos (CARPENTER, 2007). Visto isso, alguns testes comportamentais pré-clínicos são utilizados para avaliar comportamentos relacionados aos sintomas negativos da esquizofrenia em animais. O teste comportamental mais utilizado neste contexto é o de interação social (NEILL et al., 2010), visto que o isolamento social é um dos principais sintomas negativos deste transtorno (LYSAKER et al., 2012).

Em concordância com o observado na clínica dos sintomas negativos, nossos resultados revelaram uma redução da interação social nos animais machos e fêmeas submetidos ao modelo de esquizofrenia dos dois desafios. De maneira semelhante, um estudo anterior do

nosso grupo de pesquisa demonstrou uma redução na interação social em camundongos machos submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido pela administração repetida de cetamina (VASCONCELOS et al., 2015b), sendo esta alteração comportamental associada a sintomas tipo esquizofrenia "negativos" (ELLENBROEK et al., 2000). Ademais, a redução desse parâmetro foi prevenida pela administração de CAND durante a adolescência e início da fase adulta, mostrando, desta forma, que a CAND foi capaz de prevenir os sintomas negativos do tipo esquizofrenia no modelo animal de dois desafios em ambos os sexos. Resultado semelhante foi observado, em estudo anterior em que a CAND mostrou-se capaz de reduzir o comportamento de doença em modelo animal de inflamação cerebral induzido por LPS em ratos, melhorando o isolamento, a interação social e o apetite (BENICKY et al., 2011b; SAAVEDRA, 2012b).

Na esquizofrenia, a disfunção cognitiva não é global e generalizada, mas sim específica e seletiva, incluindo problemas de atenção e percepção, resolução de problemas, memória de curto e longo prazo e em particular a memória de trabalho (BÉGOU et al., 2008). Semelhante ao observado na clínica dos sintomas cognitivos da esquizofrenia, nossos dados revelam que os animais machos e fêmeas submetidos aos dois desafios apresentaram prejuízo na memória de trabalho, avaliada através do teste de labirinto em Y. Corroborando com estudo anterior que, de forma semelhante, também observou uma redução a memória de trabalho em ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzido por “dois desafios” (MONTE et al., 2017b).

Em relação ao efeito da CAND na memória de trabalho avaliada pelo teste de labirinto em Y, fêmeas e machos expostos aos dois desafios e tratados com CAND apresentaram uma melhora desse parâmetro, evidenciando que a CAND foi eficiente em prevenir os sintomas tipo cognitivos induzidos pelo modelo. Resultado similar foi observado em um estudo anterior, onde a CAND preveniu os déficits de memória de trabalho em camundongos submetidos ao modelo de mania induzido por anfetamina (DE SOUZA GOMES et al., 2015). Colaborando com nossos resultados, estudo anterior demonstrou que fármacos BRAs, como losartana e valsartana, atenuaram o déficit de memória induzido pela escopolamina e mostraram propriedades que melhoram a memória, evidenciado uma alternativa segura para o tratamento de distúrbios que envolvem a sintomatologia de défice cognitivos (NADE et al., 2015).

Desta forma, a CAND foi capaz de prevenir todas as alterações comportamentais resultantes da exposição combinada das adversidades ambientais de ativação imunológica pré-natal e o estresse na puberdade em camundongos de ambos os sexos. Adversidades essas que

podem de fato interagir umas com as outras no desenvolvimento de disfunções cerebrais e comportamentais em adultos.

***Estudo das alterações oxidativas, nitrosativas e pró-inflamatórias da esquizofrenia induzidas pelo modelo de dois desafios e o efeito preventivo da candesartana nestas alterações.***

Evidências anteriores destacam que a maioria dos efeitos fisiológicos e patológicos da ativação do SRA são consequência da ativação dos receptores AT1 pela angiotensina II tanto no cérebro como na periferia (BENICKY et al., 2011a; SAAVEDRA, 2005; SAAVEDRA; BENICKY; ZHOU, 2006a). A hiperativação da sinalização dos receptores AT1 está relacionada com o comprometimento cognitivo, morte celular e inflamação (AHMED et al., 2018; LABANDEIRA-GARCIA et al., 2017; XIA; LAZARTIGUES, 2008; ZHANG et al., 2012). Sugerindo, assim, que o aumento da expressão dos receptores AT1 no hipocampo dos animais machos submetidos aos dois desafios tem um papel importante no surgimento das alterações neuroquímicas induzidas pelo modelo, porém de forma diferenciada nos animais machos e fêmeas.

Em relação à ausência de alterações na expressão de AT1 nas fêmeas, estudo abordando as diferenças sexuais na expressão do receptor AT1 relata que essa expressão é regulada negativamente pelo estrogênio em tecidos periféricos e centrais de ratos, mostrando, desta forma, a interferência do estrógeno no SRA (DEAN et al., 2005; GIRONACCI et al., 2013). Corroborando com nossos achados, XUE e colaboradores (2014) demonstraram que as fêmeas são protegidas da sensibilização induzida por angiotensina II através do estrógeno, o que leva a regulação do SRA cerebral.

Ademais, entre os muitos reguladores endógenos da função hipocampal, o estrógeno e a progesterona se destacam por sua relevância para a saúde humana e doenças. Em seres humanos, o humor, a cognição e a ativação do hipocampo oscilam em resposta à circulação dos níveis de esteroides ovarianos durante todo o ciclo menstrual (ROSENBERG; PARK, 2002). Similarmente, em ratos e camundongos, a fase do ciclo estral modula a excitabilidade hipocampal e alguns comportamentos dependentes do hipocampo (KOROL et al., 2004; SCHARFMAN et al., 2003). Supomos, portanto, que há uma relação entre o hipocampo e o estrógeno, portanto as dosagens neuroquímicas e de expressão proteica foram realizadas nesta área cerebral, no sentido de tentar atrelar os resultados aqui encontrados às diferenças de sexo.

Como destacado anteriormente, o uso da candesartana, fármaco bloqueador dos receptores AT1 da angiotensina II, preveniu o aumento da expressão desses receptores nos

animais machos. Em concordância com os nossos achados, estudos prévios mostram que o uso de BRAs reduz a expressão dos receptores AT1 induzida pela administração de LPS levantando a hipótese de que os BRAs reduzem os mecanismos de transdução de sinal pró-inflamatórios incluindo ativação de NF- $\kappa$ B, proteína ativadora-1 (AP-1), Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), NADPH oxidase e geração excessiva de EROs, ativação da micróglia e outras vias de sinalização da inflamação (DANDONA et al., 2003; GUHA; MACKMAN, 2001; ZHANG et al., 2010b).

De fato, angiotensina II é conhecida por ser um mediador pró-inflamatório quando ligada ao seu receptor específico AT1, provocando a ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular envolvidas na produção de espécies reativas que, por sua vez levam à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Isso permite que o NF- $\kappa$ B migre para o núcleo para induzir um aumento na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e enzimas que geram EROs, gerando alterações extensas nas vias de sinalização celular e molecular (DANDONA et al., 2003; KIM et al., 2012; PUEYO et al., 2000).

Tendo em vista que o NF- $\kappa$ B é um importante fator de transcrição que regula uma ampla variedade de processos celulares e vias de sinalização (LEZOUALC'H; BEHL, 1998), determinamos a expressão proteica deste fator para melhor compreender o seu papel na ativação sequencial da inflamação e da formação de espécies reativas. Nossos dados revelaram um aumento na expressão proteica do NF- $\kappa$ B nos animais machos submetidos ao modelo de dois desafios, sendo o tratamento preventivo com a CAND capaz de prevenir esse aumento. Estes dados corroboram com a maior expressão proteica dos receptores AT1 encontrada nos animais machos submetidos ao modelo e sugerem um papel protetor do uso de BRAs na prevenção dos processos pró-inflamatórios e pró-oxidantes mediados pela angiotensina II.

Em relação às fêmeas submetidas aos dois desafios, não encontramos nenhuma alteração em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com CAND, provavelmente devido ao efeito protetor do estrógeno nas fêmeas, que atua regulando a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo (LASARTE et al., 2013).

Visto isso, avaliamos o efeito protetor da CAND sobre os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-4, três citocinas com funções imunológicas bem caracterizadas e evidências de um papel no SNC, no hipocampo dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia dos dois desafios. Ademais, uma série de evidências tem apontado para o papel de mediadores inflamatórios em transtornos neuropsiquiátricos como a esquizofrenia (ARICIOGLU et al., 2016; MÜLLER et al., 2015).

A IL-4 é um participante crítico das funções cerebrais, como memória e aprendizagem, e pode estar relacionada com as respostas anti-inflamatórias (GADANI et al., 2012), como evidenciado nas fêmeas do grupo controle em relação aos machos do grupo controle. No entanto, sob certas condições, também está envolvida em alterações pró-inflamatórias (MAJOR; FLETCHER; HAMILTON, 2002), como demonstrado em nossos resultados e em estudo anterior utilizando modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração repetida de cetamina (DA SILVA ARAÚJO et al., 2017). Nossos resultados revelam também que esse aumento dos níveis de IL-4 só está presente nos animais machos submetidos aos dois desafios.

A valer, essa elevação de citocinas pró-inflamatórias apenas nos animais machos também foi demonstrada para os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória que regula processos neurodegenerativos e neuroprotetores no cérebro e está envolvida na modulação da plasticidade sináptica (Allan et al., 2005). Além disso, em concordância com nossos resultados mostra-se elevada no sangue e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com psicose de primeiro episódio e recidivas agudas; e em pacientes com primeiro episódio de esquizofrenia, respectivamente (MILLER et al., 2011; SÖDERLUND et al., 2009), podendo estar relacionada ao estado de psicose.

Já o TNF- $\alpha$  tem papel importante na morte celular neuronal, neurogênese e na resposta imunológica inata e adaptativa (IOSIF et al., 2006), sendo, em concordância com nossos dados, demonstrado em vários estudos o aumento dos seus níveis em pacientes com esquizofrenia (O'BRIEN; SCULLY; DINAN, 2008; SONG et al., 2013). Em síntese, nossos dados demonstraram níveis aumentados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL4 apenas nos animais machos submetidos ao modelo dos dois desafios, enquanto que as fêmeas não apresentaram alterações significativas.

Estes resultados sugerem mais uma evidência quanto ao papel protetor do estrógeno nas fêmeas submetidas aos “dois desafios” (CRIDER; PILLAI, 2017; KULKARNI et al., 2001), mais especificamente, sugere a ação anti-inflamatória como um mecanismo dos efeitos neuroprotetores do estrógeno. Nossos achados corroboram com os estudos prévios em que marcadores inflamatórios, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , proteína inflamatória macrofágica 1 e fator estimulador de colônia de macrófagos estão aumentados após ovariectomia, evidenciando que a neuroinflamação é fortemente influenciada pela privação hormonal (BENEDUSI et al., 2012). Além disso, o estrógeno ao ativar seus receptores (ERs) medeia à inibição da atividade do NF- $\kappa$ B (KALAITZIDIS; GILMORE, 2005), que por sua vez regula a expressão de genes da resposta pró-inflamatória (O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997).

Além da regulação mediada pelo NF- $\kappa$ B, no cérebro, a expressão aumentada do receptor AT1 está associada à inflamação periférica e central, podendo gerar uma lesão neuronal (BENICKY et al., 2011b). Tal aumento da expressão desses receptores também foi revelado nos animais machos submetidos ao modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia do presente estudo. Nesse sentido, a Candesartana, ao bloquear os receptores AT1 de angiotensina, atuou com atividade anti-inflamatória prevenindo o aumento das citocinas pró-inflamatórias nestes animais machos. Corroborando com esses achados, estudos prévios avaliando o bloqueio dos receptores AT1, revelaram que a superatividade desse receptor é determinante na inflamação descontrolada e excessiva, alterações na função cerebrovascular e respostas patológicas ao estresse (SAAVEDRA, 2012a; SAAVEDRA; SÁNCHEZ-LEMUS; BENICKY, 2011).

Essas descobertas nos levaram a avaliar se o estado redox também estava alterado por meio da determinação dos níveis da peroxidação lipídica e espécies reativas de nitrogênio no hipocampo e no plasma dos animais submetidos ao modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia dos dois desafios. Adicionalmente, avaliamos se o tratamento prévio com o CAND, um agente que apresenta atividade antioxidante (BILD et al., 2013), poderia prevenir as alterações desses parâmetros.

De fato, estudos prévios destacam as alterações inflamatórias e oxidativas/nitrosativas como principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na esquizofrenia (BOŠKOVIĆ et al., 2011; KIRKPATRICK; MILLER, 2013) tanto na periferia quanto no sistema nervoso central (SNC) (MEYER; SCHWARZ; MÜLLER, 2011a). Como evidência, temos que os níveis de peroxidação lipídica apresentam-se aumentados no plasma de pacientes com esquizofrenia (MAHADIK et al., 1998) e os níveis de GSH, que estima as defesas endógenas contra o estresse oxidativo, encontram-se diminuídos (DO et al., 2000; GRIMA et al., 2003). Desta forma, é possível que injúrias ambientais durante o período de desenvolvimento cerebral pós-natal juntamente com a suscetibilidade genética possam produzir alterações no sistema redox, aumentar o risco para um prejuízo do neurodesenvolvimento cerebral a longo prazo e contribuir para o aparecimento da doença na idade adulta (CABUNGCAL et al., 2013; JIANG; COWELL; NAKAZAWA, 2013).

A peroxidação lipídica é o processo metabólico pelo qual as EROs provocam deterioração oxidativa dos lipídios. Este fato pode afetar significativamente a estrutura e as funções da membrana celular (VALKO et al., 2007). Sendo frequentemente usado como um biomarcador de estresse oxidativo em diversas doenças, incluindo a esquizofrenia (ZHANG et al., 2010a). Além disso, podemos observar o aumento da peroxidação lipídica em diferentes

modelos experimentais de esquizofrenia: modelo induzido pela administração repetida de cetamina (MONTE et al., 2013; SAMPAIO et al., 2018; VASCONCELOS et al., 2015a) e em modelo neurodesenvolvimental induzido por “dois desafios” (MONTE et al., 2017b), sendo esse endofenótipo também observado em humanos (DAVISON et al., 2017; DIETRICH-MUSZALSKA; KOLIŃSKA-LUKASZUK, 2018)

Corroborando com os resultados observados em estudos prévios, nossos achados revelam um aumento da peroxidação lipídica no plasma de machos e fêmeas expostos a poly(I:C) + estresse. No entanto, no hipocampo apenas os machos expostos aos dois desafios apresentaram aumento deste parâmetro, sendo, dessa forma, observadas influências sexuais nos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo. De fato, sabe-se que as vias oxidativas são influenciadas pelo sexo (BAYIR et al., 2004; CASTAGNÉ; CUÉNOD; DO, 2004). E colaborando com nossos achados, diferentes autores propõem que ratas fêmeas produzem menos EROs que os machos (BORRÁS et al., 2003; JANG et al., 2004).

Na tentativa de explicar essa diferente resposta ao estresse oxidativo no diferentes sexos, estudos prévios sugeriram que os homens têm maiores níveis de atividade da NADPH-oxidase devido a um mecanismo mediado pela angiotensina II (BHATIA et al., 2012; DANTAS et al., 2004). De forma semelhante, foi observado que camundongos machos do tipo selvagem apresentaram um percentual de aproximadamente 75-85% maior na produção de EROs, como o superóxido e peróxido de hidrogênio, estimulada pela angiotensina II em relação às fêmeas sob as mesmas condições (DE SILVA et al., 2009), sugerindo que as fêmeas são mais resistentes ao aumento do estresse oxidativo mediado pela angiotensina II (BHATIA et al., 2012).

Adicionalmente, nossos resultados mostram que o tratamento preventivo com a candesartana preveniu o aumento da peroxidação lipídica no hipocampo dos animais machos e no plasma dos animais machos e fêmeas submetidos ao modelo dos dois desafios. Em outras condições experimentais, um estudo prévio demonstrou que o telmisartan, um BRA, atenuou o estresse oxidativo na hemorragia intracerebral experimental (JUNG et al., 2007), reforçando a influência do SRA sobre parâmetros oxidativos.

Durante várias décadas o nitrito foi considerado fisiologicamente inerte, entretanto, sabe-se atualmente que o nitrito representa um reservatório estável que pode ser reduzido a óxido nítrico (NO) bioativo e a outras espécies reativas de nitrogênio (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). Além disso, o NO pode reagir com moléculas como o ânion superóxido e formar espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Estas ERNs podem modificar macromoléculas biológicas desempenhando um papel crucial na morte celular mediada

(PATEL et al., 1999). Dessa forma, os níveis de nitrito foram mensurados com o objetivo de analisar indiretamente os níveis de NO.

Visto isso, observamos que os níveis de nitrito aumentaram no hipocampo e no plasma dos animais machos e fêmeas expostos aos dois desafios. De fato, estudos clínicos e pré-clínicos mostram a associação de alterações das vias nitrérgicas com a fisiopatologia da esquizofrenia (DIETRICH-MUSZALSKA; BARTOSZ; SADOWSKA-BARTOSZ, 2015; MONTE et al., 2017b), evidenciando inclusive uma relação desse marcador com a neuroinflamação (WALTZ et al., 2015). A CAND, por sua vez, foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de espécies reativas de nitrogênio tanto no plasma (em ambos os sexos) quanto no hipocampo (apenas nas fêmeas). Em concordância, estudos apontam que substâncias com efeito antioxidante como a CAND, por promoverem o equilíbrio oxidativo, são capazes de regular as concentrações desse marcador (BEN-AZU et al., 2018; CONUS et al., 2017; SAMPAIO et al., 2018), contribuindo para uma possível ação terapêutica na esquizofrenia.

Em um contexto patológico, a iNOS (óxido nítrico-sintase induzida) é primariamente induzida por EROs e Citocinas (por exemplo o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ ), através da ativação do NF- $\kappa$ B. A ativação excessiva da iNOS promove a produção de grandes quantidades de NO e das enzimas NADPH oxidase e xanthine oxidase produtoras de ânion ( $O^{2-}$ ) superóxido. A produção simultânea de NO e  $O^{2-}$  resulta na geração de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que por sua vez danifica moléculas alvo incluindo proteínas, glutathiona (GSH), mitocôndrias e DNA. Isto poderia implicar em morte celular em muitos ambientes clínicos e experimentais por peroxidação lipídica, diminuição da função mitocondrial e ruptura da barreira hematoencefálica (CHUNG et al., 2011; LEZA et al., 2015; LIMA-CABELLO et al., 2016).

Desta forma, a CAND foi capaz de prevenir boa parte das alterações oxidativas/nitrosativas, pró-inflamatórias e de expressão proteica resultantes da exposição combinada aos fatores de risco precoces e tardios (como demonstrado na **figura 15**), fornecendo mais um ponto de apoio para o redirecionamento de fármacos considerados seguros para serem utilizados na fase do pródromo da esquizofrenia, na tentativa de prevenir o aparecimento do primeiro episódio psicótico e melhorar os sintomas que aparecem nessa fase.



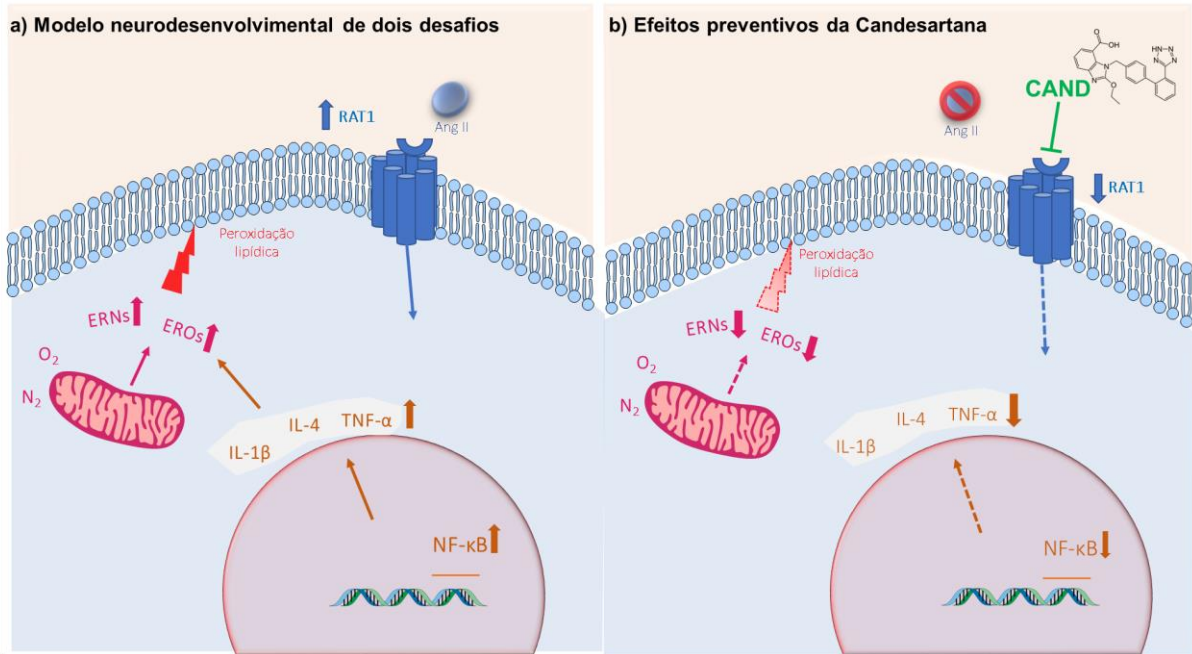


Fig 15: Esquema representativo das vias de sinalização da angiotensina II: Efeito do modelo neurodesenvolvimental de dois desafios (a) e o efeito preventivo da Candesartana (b). CAND: Candesartana; Ang II: angiotensina II, RAT1: Receptores AT1 de angiotensina II, NF-κB: Fator Nuclear kappa B, IL-1β: interleucina 1β; IL-4: interleucina 4; TNF-α: Fator de Necrose Tumoral α; ERNs: espécies reativas de nitrogênio; , e EROs: Espécies Reativas de Oxigênio. As setas preenchidas significam ativação de sinalização; as setas tracejadas significam diminuição da sinalização ou efeito; As setas para cima representam aumento ou supra-regulação e as setas para baixo representam diminuição dos níveis. (Fonte: Do próprio autor)

## 7. CONCLUSÃO

Concluimos neste estudo que machos e fêmeas apresentaram resultados comportamentais semelhantes e resultados neuroquímicos distintos induzido pelo modelo de dois desafios e, prevenido ou não, pelo tratamento com a CAND. Esses achados sobre o dimorfismo sexual tanto no modelo quanto no efeito farmacológico da CAND podem estar associados aos efeitos estrógeno nas fêmeas, acrescentando, portanto, evidências ao estudo da influência do sexo em esquizofrenia pelo uso de modelos animais baseados no desafio neonatal com Poly(I:C) e estresse na peri puberdade.

Dessa forma, nossos resultados apontam para uma forte interação entre desafio imunológico na fase neonatal e eventos estressores na adolescência contribuindo para o desenvolvimento de alterações comportamentais e neuroquímicas associadas com o transtorno esquizofrênico na idade adulta, os quais podem ser prevenidos, em parte, pelo tratamento com a CAND, mostrando que o uso deste antagonista de receptor AT1 da angiotensina II pode ser uma alternativa interessante para a condução de pesquisas com modelos animais com validade translacional para psiquiatria. Finalmente, nosso estudo pode estimular e orientar o desenho de pesquisas que abordem novas metas para intervenções sexo-específicas (preventivas ou terapêuticas) na esquizofrenia.

## REFERÊNCIAS

- ABI-DARGHAM, A.; MOORE, H. Prefrontal DA transmission at D1 receptors and the pathology of schizophrenia. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 9, n. 5, p. 404–16, out. 2003.
- ADDINGTON, J.; HEINSSSEN, R. Prediction and Prevention of Psychosis in Youth at Clinical High Risk. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 8, n. 1, p. 269–289, abr. 2012.
- AGID, O.; KAPUR, S.; REMINGTON, G. Emerging drugs for schizophrenia. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 13, n. 3, p. 479–95, set. 2008.
- AHMED, H. A. et al. Role of angiotensin system modulation on progression of cognitive impairment and brain MRI changes in aged hypertensive animals – A randomized double-blind pre-clinical study. **Behavioural Brain Research**, v. 346, p. 29–40, jul. 2018.
- AL-ASMARI, A.; KHAN, M. W. Inflammation and schizophrenia. **Human & Experimental Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 115–122, fev. 2014.
- ALLEN, A. J. et al. Endophenotypes in schizophrenia: a selective review. **Schizophrenia research**, v. 109, n. 1–3, p. 24–37, abr. 2009.
- ALTAMURA, A. C.; BUOLI, M.; SERATI, M. Duration of illness and duration of untreated illness in relation to drug response in psychiatric disorders. **Neuropsychiatry**, v. 1, n. 1, p. 81–90, 10 fev. 2011.
- ALTINOZ, M. A. et al. The NF- $\kappa$ B signaling pathway: an important therapeutic target in psychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 3, p. 490–491, 15 mar. 2018.
- ALTINOZ, M. A.; KORKMAZ, R. NF-kappaB, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase-inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen- and NSAID-prevention of the ovarian cancer. **Neoplasma**, v. 51, n. 4, p. 239–47, 2004.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM 5**. [s.l: s.n.].
- ANDERSON, G.; MAES, M. Schizophrenia: Linking prenatal infection to cytokines, the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, NMDA receptor hypofunction, neurodevelopment and neuroprogression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 42, p. 5–19, abr. 2013.
- ANGRIST, B.; KAMMEN, D. P. VA. **CNS stimulants as tools in the study of schizophrenia** *Trends in Neurosciences*, 1984.
- ARARIPE NETO, A. G. DE A.; BRESSAN, R. A.; BUSATTO FILHO, G. Fisiopatologia da esquizofrenia: aspectos atuais. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 34, n. 2, p. 198–203, 2007.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- ARICIOGLU, F. et al. Neuroinflammation in schizophrenia: a critical review and the future. **Bulletin of Clinical Psychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 429–437, 2016.

- ATLADOTTIR, H. O. et al. Autism After Infection, Febrile Episodes, and Antibiotic Use During Pregnancy: An Exploratory Study. **PEDIATRICS**, v. 130, n. 6, p. e1447–e1454, dez. 2012.
- BASMADJIAN, O. M. et al. Brain Angiotensin II Involvement in Chronic Mental Disorders. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 9, 17 nov. 2017.
- BAYER, T. A.; FALKAI, P.; MAIER, W. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the “two hit hypothesis”. **Journal of psychiatric research**, v. 33, n. 6, p. 543–8, jan. 1999.
- BAYIR, H. et al. Marked gender effect on lipid peroxidation after severe traumatic brain injury in adult patients. **Journal of neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 1–8, jan. 2004.
- BEGEMANN, M. J. H. et al. Estrogen augmentation in schizophrenia: A quantitative review of current evidence. **Schizophrenia Research**, v. 141, n. 2–3, p. 179–184, nov. 2012.
- BÉGOU, M. et al. The stop null mice model for schizophrenia displays [corrected] cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. **Neuroscience**, v. 157, n. 1, p. 29–39, 11 nov. 2008.
- BEN-AZU, B. et al. Doxycycline prevents and reverses schizophrenic-like behaviors induced by ketamine in mice via modulation of oxidative, nitrenergic and cholinergic pathways. **Brain Research Bulletin**, v. 139, p. 114–124, 2018.
- BENEDUSI, V. et al. A Lack of Ovarian Function Increases Neuroinflammation in Aged Mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 6, p. 2777–2788, jun. 2012.
- BENICKY, J. et al. Angiotensin II AT1receptor blockade ameliorates brain inflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 857–870, 2011a.
- BENICKY, J. et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 857–70, mar. 2011b.
- BHATIA, K. et al. Oxidative stress contributes to sex differences in angiotensin II-mediated hypertension in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 2, p. R274–R282, 15 jan. 2012.
- BILD, W. et al. Inhibition of central angiotensin II enhances memory function and reduces oxidative stress status in rat hippocampus. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 43, p. 79–88, jun. 2013.
- BORA, E. et al. Cognitive deficits in youth with familial and clinical high risk to psychosis: a systematic review and meta-analysis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 130, n. 1, p. 1–15, jul. 2014.
- BORA, E. et al. Duration of untreated psychosis and neurocognition in first-episode psychosis: A meta-analysis. **Schizophrenia Research**, 2017.
- BORRÁS, C. et al. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression

and lower oxidative damage than males. **Free radical biology & medicine**, v. 34, n. 5, p. 546–52, mar. 2003.

BOŠKOVIĆ, M. et al. Oxidative stress in schizophrenia. **Current neuropharmacology**, v. 9, n. 2, p. 301–12, jun. 2011.

BOTELHO-ONO, M. S. et al. Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 159, n. 1–2, p. 38–44, 2011.

BRAFF, D. L. et al. Female schizophrenia patients have prepulse inhibition deficits. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 7, p. 817–820, 2005.

BRAFF, D. L. et al. Deconstructing schizophrenia: an overview of the use of endophenotypes in order to understand a complex disorder. **Schizophrenia bulletin**, v. 33, n. 1, p. 21–32, jan. 2007.

BRAFF, D. L.; LIGHT, G. A. The use of neurophysiological endophenotypes to understand the genetic basis of schizophrenia. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 125–35, jan. 2005.

BRAMNESS, J. G. et al. Amphetamine-induced psychosis--a separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? **BMC psychiatry**, v. 12, p. 221, 5 dez. 2012.

BRIGGS, R. **Witches and Neighbours: The Social and Cultural Context of European Witchcraft**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2002.

BROWN, A. The environment and susceptibility to schizophrenia. **Prog Neurobiol**, v. 93, p. 23–58, 2011a.

BROWN, A. S. et al. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. **Archives of general psychiatry**, v. 61, n. 8, p. 774–80, ago. 2004.

BROWN, A. S. Exposure to Prenatal Infection and Risk of Schizophrenia. **Frontiers in Psychiatry**, v. 2, p. 63, 2011b.

BUKA, S. L. et al. Maternal Exposure to Herpes Simplex Virus and Risk of Psychosis Among Adult Offspring. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 809–815, 2008.

CABUNGCAL, J.-H. et al. Early-Life Insults Impair Parvalbumin Interneurons via Oxidative Stress: Reversal by N-Acetylcysteine. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 6, p. 574–582, 15 mar. 2013.

CAPLAN, G. **Principles of Preventive Psychiatry**. [s.l.] Oxford, England: Basic Books, 1964.

CARPENTER, W. T. Schizophrenia: Disease, Syndrome, or Dimensions? **Family Process**, v. 46, n. 2, p. 199–206, jun. 2007.

CASTAGNÉ, V.; CUÉNOD, M.; DO, K. Q. An animal model with relevance to schizophrenia: sex-dependent cognitive deficits in osteogenic disorder-Shionogi rats induced by glutathione synthesis and dopamine uptake inhibition during development. **Neuroscience**,

v. 123, n. 4, p. 821–34, 2004.

CHAN, V. Schizophrenia and Psychosis Diagnosis, Current Research Trends, and Model Treatment Approaches with Implications for Transitional Age Youth. 2017.

CHINDO, B. A. et al. Ketamine-enhanced immobility in forced swim test: a possible animal model for the negative symptoms of schizophrenia. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 38, n. 2, p. 310–6, 7 ago. 2012.

CHUNG, H. Y. et al. Molecular Inflammation as an Underlying Mechanism of the Aging Process and Age-related Diseases. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 7, p. 830–840, 29 jul. 2011.

COHEN, R. Z. et al. Earlier Puberty as a Predictor of Later Onset of Schizophrenia in Women. **Am J Psychiatry**, v. 156, n. 156, p. 1059–1064, 1999.

COMPTON, M. T. Considering schizophrenia from a prevention perspective. **American journal of preventive medicine**, v. 26, n. 2, p. 178–85, mar. 2004.

CONLEY, R. R.; KELLY, D. L. Management of treatment resistance in schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 50, n. 11, p. 898–911, dez. 2001.

CONUS, P. et al. N-acetylcysteine in a Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial: Toward Biomarker-Guided Treatment in Early Psychosis. **Schizophrenia Bulletin**, 2017.

COUGHLIN, J. M. et al. Marked reduction of soluble superoxide dismutase-1 (SOD1) in cerebrospinal fluid of patients with recent-onset schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 1, p. 10–11, jan. 2013.

COYLE, J. T. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. **Harvard review of psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 241–53, 1996.

CRIDER, A.; PILLAI, A. Estrogen Signaling as a Therapeutic Target in Neurodevelopmental Disorders. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 48–58, 1 jan. 2017.

DA SILVA ARAÚJO, T. et al. Reversal of schizophrenia-like symptoms and immune alterations in mice by immunomodulatory drugs. **Journal of Psychiatric Research**, v. 84, p. 49–58, jan. 2017.

DALL'IGNA, O. P. et al. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental neurology**, v. 203, n. 1, p. 241–5, jan. 2007.

DANDONA, P. et al. Angiotensin II Receptor Blocker Valsartan Suppresses Reactive Oxygen Species Generation in Leukocytes, Nuclear Factor- $\kappa$ B, in Mononuclear Cells of Normal Subjects: Evidence of an Antiinflammatory Action. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 9, p. 4496–4501, set. 2003.

DANTAS, A. P. V et al. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. **Cardiovascular research**, v. 61, n. 1, p. 22–9, 1 jan. 2004.

DAVIS, M. The Mammalian Startle Response. In: **Neural Mechanisms of Startle Behavior**. [s.l.: s.n.].

DAVISON, J. et al. A systematic review of metabolite biomarkers of schizophrenia. **Schizophrenia Research**, 2017.

DE GÓIS QUEIROZ, A. I. et al. Angiotensin receptor blockers for bipolar disorder. **Medical Hypotheses**, v. 80, n. 3, p. 259–263, mar. 2013.

DE QUEIROZ, T. M.; MONTEIRO, M. M. O.; BRAGA, V. A. Angiotensin-II-derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: New perspectives. **Frontiers in Physiology**, v. 4 MAY, n. May, p. 1–6, 2013.

DE SILVA, T. M. et al. Gender Influences Cerebral Vascular Responses to Angiotensin II Through Nox2-Derived Reactive Oxygen Species. **Stroke**, v. 40, n. 4, p. 1091–1097, abr. 2009.

DE SOUZA GOMES, J. A. et al. Antimanic-like activity of candesartan in mice: Possible involvement of antioxidant, anti-inflammatory and neurotrophic mechanisms. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 11, p. 2086–2097, nov. 2015.

DEAN, S. A. et al. 17 $\beta$ -Estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 3, p. R759–R766, mar. 2005.

DESBONNET, L.; WADDINGTON, J. L.; O'TUATHAIGH, C. M. P. Mutant models for genes associated with schizophrenia. **Biochemical Society transactions**, v. 37, n. Pt 1, p. 308–12, fev. 2009.

DESLAURIERS, J. et al.  $\alpha$ -Lipoic acid interaction with dopamine D2 receptor-dependent activation of the Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway induced by antipsychotics: potential relevance for the treatment of schizophrenia. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 50, n. 1, p. 134–45, maio 2013.

DEUTSCH, S. I. et al. A "glutamatergic hypothesis" of schizophrenia. Rationale for pharmacotherapy with glycine. **Clinical neuropharmacology**, v. 12, n. 1, p. 1–13, fev. 1989.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOSZ, I. The Role of Nitric Oxide and Nitrosative Stress in Schizophrenia. In: DIETRICH-MUSZALSKA, A.; CHAUHAN, V.; GRIGNON, S. (Eds.). **Studies on Psychiatric Disorders**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 299–326.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; KOLIŃSKA-LUKASZUK, J. Comparative effects of aripiprazole and selected antipsychotic drugs on lipid peroxidation in plasma. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, 2018.

DO, K. Q. et al. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. **The European journal of neuroscience**, v. 12, n. 10, p. 3721–8, out. 2000.

DO, K. Q. et al. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 19, n. 2, p. 220–230, abr. 2009.

- DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free radical biology & medicine**, v. 15, n. 4, p. 353–363, out. 1993.
- ELKAHLOUN, A. G.; HAFKO, R.; SAAVEDRA, J. M. An integrative genome-wide transcriptome reveals that candesartan is neuroprotective and a candidate therapeutic for Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 5, 28 jan. 2016.
- ELLENBROEK, B. A et al. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. **Behavioural pharmacology**, v. 11, n. 3–4, p. 223–33, 2000.
- EMILIANI, F. E.; SEDLAK, T. W.; SAWA, A. Oxidative stress and schizophrenia. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 27, n. 3, p. 185–190, 2014.
- ERANTI, S. . et al. Gender difference in age at onset of schizophrenia: a meta-analysis. **Psychological Medicine**, v. 43, n. 1, p. 155–167, 2013.
- FALKAI, P. et al. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of schizophrenia, part 2: long-term treatment of schizophrenia. **The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry**, v. 7, n. 1, p. 5–40, jan. 2006.
- FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. **Schizophrenia bulletin**, v. 35, n. 3, p. 528–48, maio 2009.
- FEIGENSON, K. A.; KUSNECOV, A. W.; SILVERSTEIN, S. M. Inflammation and the two-hit hypothesis of schizophrenia. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 38, p. 72–93, jan. 2014.
- FEINBERG, I. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? **Journal of psychiatric research**, v. 17, n. 4, p. 319–34, 1982.
- FENDRI, C. et al. [Oxidative stress involvement in schizophrenia pathophysiology: a review]. **L'Encéphale**, v. 32, n. 2 Pt 1, p. 244–52, 2006.
- FILLMAN, S. G. et al. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 2, p. 206–214, fev. 2013.
- FINK, G. et al. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 16, n. 3, p. 325–44, jun. 1996.
- FISHER, H. L. et al. The varying impact of type, timing and frequency of exposure to childhood adversity on its association with adult psychotic disorder. **Psychological medicine**, v. 40, n. 12, p. 1967–78, 24 dez. 2010.
- FUSAR-POLI, P. et al. Predicting Psychosis. **Archives of General Psychiatry**, v. 69, n. 3, p. 220, mar. 2012.
- FUSAR-POLI, P.; POLITI, P. Paul Eugen Bleuler and the birth of schizophrenia (1908). **The American journal of psychiatry**, v. 165, n. 11, p. 1407, nov. 2008.



GADANI, S. P. et al. IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4213–4219, 1 nov. 2012.

GAEBEL, W. **Schizophrenia: Current Science and Clinical Practice**. [s.l.: s.n.].

GARD, P. R. Angiotensin as a target for the treatment of Alzheimer's disease, anxiety and depression. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 8, n. 1, p. 7–14, fev. 2004.

GEYER, M. A.; MCILWAIN, K. L.; PAYLOR, R. Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review. **Molecular psychiatry**, v. 7, n. 10, p. 1039–53, jan. 2002.

GIBNEY, S. M.; DREXHAGE, H. A. Evidence for a dysregulated immune system in the etiology of psychiatric disorders. **Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 900–20, out. 2013.

GIOVANOLI, S. et al. Stress in Puberty Unmasks Latent Neuropathological Consequences of Prenatal Immune Activation in Mice. **Science**, v. 339, n. 6123, p. 1095–1099, 2013a.

GIOVANOLI, S. et al. Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6123, p. 1095–9, mar. 2013b.

GIOVANOLI, S.; WEBER, L.; MEYER, U. **Single and combined effects of prenatal immune activation and peripubertal stress on parvalbumin and reelin expression in the hippocampal formation** **Brain, Behavior, and Immunity**. [s.l.: s.n.].

GIRONACCI, M. M. et al. Neuromodulatory role of angiotensin-(1–7) in the central nervous system. **Clinical Science**, v. 125, n. 2, p. 57–65, 1 jul. 2013.

GLEITER, C. H. et al. Candesartan. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 22, n. 4, p. 263–284, 2006.

GOGOS, A. et al. A Role for Estrogen in Schizophrenia: Clinical and Preclinical Findings. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, 2015.

GOLDSMITH, D. R.; RAPAPORT, M. H.; MILLER, B. J. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 12, p. 1696–1709, 23 dez. 2016.

GOURZIS, P.; KATRIVANOU, A.; BERATIS, S. Symptomatology of the initial prodromal phase in schizophrenia. **Schizophrenia bulletin**, v. 28, n. 3, p. 415–29, jan. 2002.

GRAHAM, F. K. The More or Less Startling Effects of Weak Prestimulation. **Psychophysiology**, v. 12, n. 3, p. 238–248, maio 1975.

GREEN, L.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56–58, abr. 1981.

GRIMA, G. et al. Dopamine-induced oxidative stress in neurons with glutathione deficit: implication for schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 62, n. 3, p. 213–24, 1 ago. 2003.

GRÜNDER, G.; CUMMING, P. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Current Status.

**The Neurobiology of Schizophrenia**, p. 109–124, 1 jan. 2016.

GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular signalling**, v. 13, n. 2, p. 85–94, fev. 2001.

HÄFNER, H. et al. Sex differences in schizophrenic diseases. **Fortschritte der Neurologie · Psychiatrie**, v. 59, n. 09, p. 343–360, set. 1991.

HÄFNER, H. et al. Generating and testing a causal explanation of the gender difference in age at first onset of schizophrenia. **Psychological medicine**, v. 23, n. 4, p. 925–40, nov. 1993.

HÄNNINEN, K. et al. Interleukin-1 beta gene polymorphism and its interactions with neuregulin-1 gene polymorphism are associated with schizophrenia. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 258, n. 1, p. 10–15, dez. 2007.

HANSON, D. R.; GOTTESMAN, I. I. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. **BMC Medical Genetics**, v. 6, n. 1, p. 7, dez. 2005.

HAROON, E.; RAISON, C. L.; MILLER, A. H. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 137–62, jan. 2012.

HARRISON, P. The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. **Psychopharmacology**, v. 174, n. 1, jun. 2004.

HARVEY, C. R. et al. Four behavioural syndromes of schizophrenia. **The British Journal of Psychiatry**, v. 168, n. 5, p. 562–570, 1 maio 1996.

HOFFMAN, H. S.; ISON, J. R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychological Review**, v. 87, n. 2, p. 175–189, 1980a.

HOFFMAN, H. S.; ISON, J. R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychological review**, v. 87, n. 2, p. 175–89, mar. 1980b.

HOWES, O. D. et al. Midbrain dopamine function in schizophrenia and depression: a post-mortem and positron emission tomographic imaging study. **Brain : a journal of neurology**, 2013.

HUANG, D.; LIU, S. Oxidative Stress and Schizophrenia. **Journal of Psychiatry and Brain Science**, v. 2, n. 4, 25 abr. 2017.

HWANG, Y. et al. Gene expression profiling by mRNA sequencing reveals increased expression of immune/inflammation-related genes in the hippocampus of individuals with schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 3, n. 10, p. e321, out. 2013.

IOSIF, R. E. et al. Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Is a Negative Regulator of Progenitor Proliferation in Adult Hippocampal Neurogenesis. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 38, p. 9703–9712, 20 set. 2006.

- ISHRAT, T. et al. Low-Dose Candesartan Enhances Molecular Mediators of Neuroplasticity and Subsequent Functional Recovery After Ischemic Stroke in Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 3, p. 1542–1553, 2 jun. 2015.
- ITO, M. et al. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 8, p. 3521–5, 11 abr. 1995.
- JABLENSKY, A. The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 271–87, jan. 2010.
- JANG, Y. M. et al. Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. **FEBS Letters**, v. 577, n. 3, p. 483–490, nov. 2004.
- JIA, P. et al. Common variants conferring risk of schizophrenia: a pathway analysis of GWAS data. **Schizophrenia research**, v. 122, n. 1–3, p. 38–42, set. 2010.
- JIANG, Z.; COWELL, R. M.; NAKAZAWA, K. Convergence of genetic and environmental factors on parvalbumin-positive interneurons in schizophrenia. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, p. 116, 3 set. 2013.
- JONES, C. et al. Animal models of schizophrenia. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1162–1194, 2011.
- JUNG, K.-H. et al. Blockade of AT1 Receptor Reduces Apoptosis, Inflammation, and Oxidative Stress in Normotensive Rats with Intracerebral Hemorrhage. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 3, p. 1051–1058, 1 jun. 2007.
- KAHN, R. S. et al. Schizophrenia. **Nature Reviews Disease Primers**, 2015.
- KAIDANOVICH-BEILIN, O. et al. Assessment of social interaction behaviors. **Journal of visualized experiments : JoVE**, 2011.
- KALAITZIDIS, D.; GILMORE, T. D. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF- $\kappa$ B. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 46–52, mar. 2005.
- KANDEL, E. R. **Principles of neural science**. 5th. ed. [s.l.] McGraw-Hill Education/Medical, 2012.
- KAPUR, S.; REMINGTON, G. Atypical antipsychotics: new directions and new challenges in the treatment of schizophrenia. **Annual review of medicine**, v. 52, p. 503–17, jan. 2001.
- KAPUR, S.; SEEMAN, P. Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. **The American journal of psychiatry**, v. 158, n. 3, p. 360–9, mar. 2001.
- KEEFE, R. S. E. et al. Neurocognitive Effects of Antipsychotic Medications in Patients With Chronic Schizophrenia in the CATIE Trial. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 633, jun. 2007.
- KELLER, W. R. et al. A review of anti-inflammatory agents for symptoms of schizophrenia. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 4, p. 337–42, abr. 2013.

- KESHAVAN, M. S. Development, disease and degeneration in schizophrenia: a unitary pathophysiological model. **Journal of psychiatric research**, v. 33, n. 6, p. 513–21, 1999.
- KESHAVAN, M. S.; AMIRSADRI, A. Early intervention in schizophrenia: current and future perspectives. **Current psychiatry reports**, v. 9, n. 4, p. 325–8, ago. 2007.
- KESHAVAN, M. S.; HOGARTY, G. E. Brain maturational processes and delayed onset in schizophrenia. **Development and Psychopathology**, v. 11, n. 3, p. 525–543, 1999.
- KIM, J. M. et al. Mechanism of Ang II involvement in activation of NF- $\kappa$ B through phosphorylation of p65 during aging. **Age**, v. 34, n. 1, p. 11–25, fev. 2012.
- KIM, Y.-K.; NA, K.-S. Neuroprotection in Schizophrenia and Its Therapeutic Implications. **Psychiatry investigation**, v. 14, n. 4, p. 383–391, jul. 2017.
- KIRKPATRICK, B.; MILLER, B. J. Inflammation and schizophrenia. **Schizophrenia bulletin**, v. 39, n. 6, p. 1174–9, nov. 2013.
- KISHI, T.; HIROOKA, Y.; SUNAGAWA, K. Telmisartan protects against cognitive decline via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B in hippocampus of hypertensive rats. **Journal of cardiology**, v. 60, n. 6, p. 489–494, dez. 2012.
- KOGA, M.; SERRITELLA, A. V.; SEDLAK, T. W. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. **Schizophrenia Research**, v. 176, n. 1, p. 52–71, 2016.
- KOHL, S. et al. **Prepulse inhibition in psychiatric disorders - Apart from schizophrenia** *Journal of Psychiatric Research*, 2013.
- KOO, J. W. et al. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 6, p. 2669–74, 9 fev. 2010.
- KOROL, D. L. et al. Shifts in preferred learning strategy across the estrous cycle in female rats. **Hormones and Behavior**, v. 45, n. 5, p. 330–338, maio 2004.
- KRINGELBACH, M. L.; BERRIDGE, K. C. Towards a functional neuroanatomy of pleasure and happiness. **Trends in cognitive sciences**, v. 13, n. 11, p. 479–87, nov. 2009.
- KROKEN, R. A. et al. A critical review of pro-cognitive drug targets in psychosis: convergence on myelination and inflammation. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 11, jan. 2014.
- KULKARNI, J. et al. Estrogen — a potential treatment for schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 48, n. 1, p. 137–144, mar. 2001.
- KYZIRIDIS, T. C. Notes on the history of schizophrenia. **German Journal of Psychiatry**, v. 8, n. 3, p. 42–48, 2005.
- LABANDEIRA-GARCIA, J. L. et al. Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, p. 129, 3 maio 2017.

- LAHON, K. et al. A retrospective study of extrapyramidal syndromes with second generation antipsychotics in the psychiatric unit of a tertiary care teaching hospital. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 3, p. 266–8, jul. 2012.
- LARSON, M. K.; WALKER, E. F.; COMPTON, M. T. Early signs, diagnosis and therapeutics of the prodromal phase of schizophrenia and related psychotic disorders. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 10, n. 8, p. 1347–59, ago. 2010.
- LARUELLE, M. et al. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 1, p. 56–72, jul. 1999.
- LASARTE, S. et al. Estradiol downregulates NF- $\kappa$ b translocation by Ikbkg transcriptional repression in dendritic cells. **Genes & Immunity**, v. 14, n. 7, p. 462–469, 25 out. 2013.
- LAURSEN, T. M. et al. Life Expectancy and Death by Diseases of the Circulatory System in Patients with Bipolar Disorder or Schizophrenia in the Nordic Countries. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67133, jun. 2013.
- LEE, C.; MCGLASHAN, T. H.; WOODS, S. W. Prevention of schizophrenia: can it be achieved? **CNS drugs**, v. 19, n. 3, p. 193–206, jan. 2005.
- LEUCHT, S. et al. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. **The Lancet**, v. 373, n. 9657, p. 31–41, 3 jan. 2009.
- LEVIN, R. et al. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1748–52, 15 ago. 2011.
- LEZA, J. C. et al. Inflammation in schizophrenia: A question of balance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 612–626, 1 ago. 2015.
- LEZOUALC'H, F.; BEHL, C. Transcription factor NF-kappaB: friend or foe of neurons? **Molecular psychiatry**, v. 3, n. 1, p. 15–20, jan. 1998.
- LIEBERMAN, J. A. Atypical antipsychotic drugs as a first-line treatment of schizophrenia: a rationale and hypothesis. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 57 Suppl 1, p. 68–71, jan. 1996.
- LIEBERMAN, J. A. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia: efficacy, safety and cost outcomes of CATIE and other trials. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 68, n. 2, p. e04, fev. 2007.
- LIMA-CABELLO, E. et al. An Abnormal Nitric Oxide Metabolism Contributes to Brain Oxidative Stress in the Mouse Model for the Fragile X Syndrome, a Possible Role in Intellectual Disability. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–12, 14 dez. 2016.
- LIN, C.-H.; LANE, H.-Y.; TSAI, G. E. Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of schizophrenia. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 100, n. 4, p. 665–77, fev. 2012.
- LONDERO, M. D. B.; MASSUDA, R.; GAMA, C. S. Neurobiologia da Esquizofrenia. In:

NARDI, A. E.; QUEVEDO, J.; SILVA, A. G. (Eds.). . **Esquizofrenia\ Teoria e Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2015. p. 45–51.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 156–167, fev. 2008.

LUO, S. X.; HUANG, E. J. **Dopaminergic neurons and brain reward pathways: From neurogenesis to circuit assembly***American Journal of Pathology*, 2016.

LYSAKER, P. H. et al. Development of personal narratives as a mediator of the impact of deficits in social cognition and social withdrawal on negative symptoms in schizophrenia. **The Journal of nervous and mental disease**, v. 200, n. 4, p. 290–5, abr. 2012.

MACÊDO, D. S. et al. Animal models of prenatal immune challenge and their contribution to the study of schizophrenia: a systematic review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 179–186, mar. 2012.

MAHADIK, S. P. et al. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. **Biological psychiatry**, v. 43, n. 9, p. 674–9, 1 maio 1998.

MAJOR, J.; FLETCHER, J. E.; HAMILTON, T. A. IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 5, p. 2456–63, 1 mar. 2002.

MARCHESE, N. A. et al. Brain Angiotensin II AT1 receptors are involved in the acute and long-term amphetamine-induced neurocognitive alterations. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 5, p. 795–807, 28 mar. 2016.

MARSH, L.; RAO, V. Psychiatric complications in patients with epilepsy: a review. **Epilepsy Research**, v. 49, n. 1, p. 11–33, mar. 2002.

MARSHALL, M. et al. Association between duration of untreated psychosis and outcome in cohorts of first-episode patients: a systematic review. **Archives of general psychiatry**, v. 62, n. 9, p. 975–83, out. 2005.

MAURICE, T.; LOCKHART, B. P.; PRIVAT, A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. **Brain research**, v. 706, n. 2, p. 181–93, 15 jan. 1996.

MAYNARD, T. M. et al. Neural development, cell-cell signaling, and the “two-hit” hypothesis of schizophrenia. **Schizophrenia bulletin**, v. 27, n. 3, p. 457–476, 2001.

MCGORRY, P. D.; GOLDSTONE, S. Early recognition and prevention of schizophrenia. In: GAEBEL, W. (Ed.). . **Schizophrenia \ Current Science and Clinical Practice**. Dusseldorf, Germany: Willey-Blackwell, 2011. p. 141–156.

MCKINLEY, M. J. et al. **The brain renin-angiotensin system: Location and physiological roles***International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2003.

MEHTA, P. K.; GRIENGLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and

pathological effects in the cardiovascular system. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 292, n. 1, p. C82-97, jan. 2007.

MELTZER, H. Y. et al. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 27, n. 7, p. 1159–72, out. 2003.

MEYER, J. M. Antipsychotic safety and efficacy concerns. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 68 Suppl 1, p. 20–6, jan. 2007.

MEYER, N.; MACCABE, J. H. Schizophrenia. **Medicine**, v. 44, n. 11, p. 649–653, nov. 2016.

MEYER, U. et al. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 4, p. 469–486, maio 2008.

MEYER, U.; FELDON, J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. **Progress in neurobiology**, v. 90, n. 3, p. 285–326, mar. 2010.

MEYER, U.; FELDON, J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1308–21, mar. 2012a.

MEYER, U.; FELDON, J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1308–1321, mar. 2012b.

MEYER, U.; SCHWARZ, M. J.; MÜLLER, N. Inflammatory processes in schizophrenia: A promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 132, n. 1, p. 96–110, out. 2011a.

MEYER, U.; SCHWARZ, M. J.; MÜLLER, N. Inflammatory processes in schizophrenia: A promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 132, n. 1, p. 96–110, out. 2011b.

MILLER, B. J. et al. Meta-Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 7, p. 663–671, out. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**, 2013.

MIYAKE, N. et al. Effects of N-Acetylcysteine on Cognitive Functions in Subjects With an At-Risk Mental State A Case Serie. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 87–88, 2016.

MIYAMOTO, S. et al. Antipsychotic Drugs. In: **Psychiatry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008. p. 2161–2201.

MIYAMOTO, S. et al. Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 12, p. 1206–1227, dez. 2012.

- MOCHCOVITCH, M. D. Primeiro episódio psicótico. In: NARDI, A. E.; QUEVEDO, J.; SILVA, A. G. (Eds.). **Esquizofrenia\ Teoria e Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2015. p. 95–106.
- MONICZEWSKI, A. et al. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 3, p. 560–568, jun. 2015.
- MONJI, A.; KATO, T.; KANBA, S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 63, n. 3, p. 257–65, jun. 2009.
- MONTE, A. S. et al. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 11, p. 1032–1043, 2013.
- MONTE, A. S. et al. Two-hit model of schizophrenia induced by neonatal immune activation and peripubertal stress in rats: Study of sex differences and brain oxidative alterations. **Behavioural Brain Research**, v. 331, p. 30–37, jul. 2017a.
- MONTE, A. S. et al. Two-hit model of schizophrenia induced by neonatal immune activation and peripubertal stress in rats: Study of sex differences and brain oxidative alterations. **Behavioural Brain Research**, v. 331, p. 30–37, 28 jul. 2017b.
- MORGAN, C. et al. Reappraising the long-term course and outcome of psychotic disorders: the AESOP-10 study. **Psychological Medicine**, v. 44, n. 13, p. 2713–2726, out. 2014.
- MÜLLER, N. et al. The role of inflammation in schizophrenia. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 372, 2015.
- NADE, V. S. et al. Cognitive enhancing effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on learning and memory. **Indian journal of pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 263–9, 2015.
- NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. **Schizophrenia**.
- NEILL, J. C. et al. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. **Pharmacology & therapeutics**, v. 128, n. 3, p. 419–32, dez. 2010.
- NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–9, out. 2010.
- NIH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals- Institute of Laboratory Animal Research- National Research Council. **National Academies Press**, 1996.
- NIKAM, S. S.; AWASTHI, A. K. Evolution of schizophrenia drugs: a focus on dopaminergic systems. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, v. 9, n. 1, p. 37–46, jan. 2008.
- O'BRIEN, S. M.; SCULLY, P.; DINAN, T. G. Increased tumor necrosis factor-alpha concentrations with interleukin-4 concentrations in exacerbations of schizophrenia. **Psychiatry research**, v. 160, n. 3, p. 256–62, 30 set. 2008.



O'NEILL, L. A.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in neurosciences**, v. 20, n. 6, p. 252–8, jun. 1997.

OCHOA, S. et al. Gender Differences in Schizophrenia and First-Episode Psychosis: A Comprehensive Literature Review. **Schizophrenia Research and Treatment**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, jun. 1979.

OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. **American journal of hypertension**, v. 21, n. 1, p. 98–104, 2008.

OWEN, M. J.; SAWA, A.; MORTENSEN, P. B. Schizophrenia. **The Lancet**, v. 388, n. 10039, p. 86–97, 2 jul. 2016.

OWEN, R. Schizophrenia - From Devilry to Disease. **Res Medica**, v. 22, n. 1, p. 126, 29 nov. 2014.

OWENS, D. C. et al. Duration of untreated illness and outcome in schizophrenia: test of predictions in relation to relapse risk. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 196, n. 4, p. 296–301, abr. 2010.

PADURARIU, M. et al. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. **Neuroscience letters**, v. 479, n. 3, p. 317–20, 2 ago. 2010.

PARBOOSING, R. et al. Gestational Influenza and Bipolar Disorder in Adult Offspring. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 7, p. 677, jul. 2013.

PATEL, R. P. et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1411, n. 2–3, p. 385–400, 1999.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 747–803, jul. 2006.

PAZ, M. C. et al. The AT1 angiotensin II receptor blockade attenuates the development of amphetamine-induced behavioral sensitization in a two-injection protocol. **Synapse**, v. 65, n. 6, p. 505–512, jun. 2011.

PEDERSEN, C. B. et al. A Comprehensive Nationwide Study of the Incidence Rate and Lifetime Risk for Treated Mental Disorders. **JAMA Psychiatry**, v. 71, n. 5, p. 573, maio 2014.

POWELL, S. B.; ZHOU, X.; GEYER, M. A. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. **Behavioural brain research**, v. 204, n. 2, p. 282–94, 7 dez. 2009.

PUEYO, M. E. et al. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, n. 3, p. 645–51, mar. 2000.

QUINN, M. T.; AMMONS, M. C. B.; DELEO, F. R. The expanding role of NADPH oxidases

in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 111, n. 1, p. 1–20, jul. 2006.

RADENOVIC, L.; SELAKOVIC, V. Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. **Brain research bulletin**, v. 67, n. 1–2, p. 133–41, set. 2005.

RADYUSHKIN, K. et al. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. **Genes Brain Behav**, v. 8, n. 4, p. 416–425, jun. 2009.

REDDY, R.; REDDY, R. Antioxidant therapeutics for schizophrenia. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 7, p. 2047–55, 1 out. 2011.

RÉUS, G. Z. et al. **The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders** *Neuroscience*, 6 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25981208>>. Acesso em: 21 ago. 2017

ROSENBERG, L.; PARK, S. Verbal and spatial functions across the menstrual cycle in healthy young women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 7, p. 835–41, out. 2002.

SAAVEDRA, J. M. Brain Angiotensin II: New Developments, Unanswered Questions and Therapeutic Opportunities. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25, n. 3–4, p. 485–512, jun. 2005.

SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. **Clinical Science**, v. 123, n. 10, p. 567–590, 2012a.

SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT(1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 123, n. 10, p. 567–90, nov. 2012b.

SAAVEDRA, J. M.; BENICKY, J.; ZHOU, J. Angiotensin II: multitasking in the brain. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. Suppl 1, p. S131–S137, mar. 2006a.

SAAVEDRA, J. M.; BENICKY, J.; ZHOU, J. Mechanisms of the Anti-Ischemic Effect of Angiotensin II AT<sub>1</sub> Receptor Antagonists in the Brain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 7–8, p. 1097–1109, 6 dez. 2006b.

SAAVEDRA, J. M.; SÁNCHEZ-LEMUS, E.; BENICKY, J. Blockade of brain angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 1, p. 1–18, jan. 2011.

SADOCK, B. **Compêndio de Psiquiatria - 11ed: Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica - Benjamin J. Sadock, Virginia A. Sadock, Pedro Ruiz - Google Livros**. 11a. ed. [s.l.] Artmed, 2016.

SAMPAIO, L. R. L. et al. Advantages of the Alpha-lipoic Acid Association with Chlorpromazine in a Model of Schizophrenia Induced by Ketamine in Rats: Behavioral and Oxidative Stress evidences. **Neuroscience**, v. 373, p. 72–81, 2018.

SAMS-DODD, F. Automation of the social interaction test by a video-tracking system: behavioural effects of repeated phencyclidine treatment. **Journal of Neuroscience Methods**,

1995.

SCHARFMAN, H. E. et al. Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 37, p. 11641–52, dez. 2003.

SEARLES, S.; MAKAREWICZ, J. A.; DUMAS, J. A. The role of estradiol in schizophrenia diagnosis and symptoms in postmenopausal women. **Schizophrenia Research**, 2017.

SELVARAJ, S. et al. **Alterations in the serotonin system in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2014.

SEMPLE, B. D. et al. **Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species** *Progress in neurobiology*, 2013.

SHUNGU, D. C. N-acetylcysteine for the treatment of glutathione deficiency and oxidative stress in schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 71, n. 11, p. 937–8, 1 jun. 2012.

SILVEIRA, R. D. Psicanálise e psiquiatria nos inícios do século XX: a apropriação do conceito de esquizofrenia no trabalho de Hermelino Lopes Rodrigues. **Revista Latinoamericana De Psicopatologia fundamental**, v. 12, n. 3, p. 582–596, 2009.

SIMONSEN, E. et al. Clinical epidemiologic first-episode psychosis: 1-year outcome and predictors. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 116, n. 1, p. 54–61, jul. 2007.

SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. **Neuroscience**, 2007.

SÖDERLUND, J. et al. Activation of brain interleukin-1 $\beta$  in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 12, p. 1069–1071, 18 dez. 2009.

SOMMER, I. E. et al. Early interventions in risk groups for schizophrenia: what are we waiting for? **npj Schizophrenia**, v. 2, n. January, p. 16003, 2016.

SONG, X. et al. Elevated levels of adiponectin and other cytokines in drug naïve, first episode schizophrenia patients with normal weight. **Schizophrenia Research**, v. 150, n. 1, p. 269–273, out. 2013.

SOUZA, E. L. DE et al. Cognitive-behavioral therapy in prevention of psychosis in at-risk populations. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, v. 9, n. 1, p. 19–25, 2013.

STAHL, S. M. Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. **CNS spectrums**, v. 12, n. 4, p. 265–8, maio 2007.

STAHL, S. M. **Stahl's Essential Psychopharmacology - Neuroscientific Basis and Practical Application**. New York: Cambridge University Press, 2013.

STEULLET, P. et al. Redox dysregulation, neuroinflammation, and NMDA receptor hypofunction: A “central hub” in schizophrenia pathophysiology? **Schizophrenia Research**, v. 176, n. 1, p. 41–51, 2016.

STEVENS, J. R. Neuropathology of schizophrenia. **Archives of general psychiatry**, v. 39, n. 10, p. 1131–9, out. 1982.

SWAYZE, V. W. Frontal leukotomy and related psychosurgical procedures in the era before antipsychotics (1935-1954): a historical overview. **American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 4, p. 505–515, abr. 1995.

SWERDLOW, N. et al. Effects of spiperone, raclopride, SCH 23390 and clozapine on apomorphine inhibition of sensorimotor gating of the startle response in the rat. **Journal of Pharmacology and ...**, p. 530–536, 1991.

SWERDLOW, N. R. et al. Amphetamine disruption of prepulse inhibition of acoustic startle is reversed by depletion of mesolimbic dopamine. **Psychopharmacology**, v. 100, n. 3, p. 413–416, mar. 1990.

SWERDLOW, N. R. et al. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 331–88, ago. 2008.

SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A. Using an Animal Model of Deficient Sensorimotor Gating to Study the Pathophysiology and New Treatments of Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 285–301, jan. 1998.

TANDON, R. et al. World Psychiatric Association Pharmacopsychiatry Section statement on comparative effectiveness of antipsychotics in the treatment of schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 100, n. 1–3, p. 20–38, mar. 2008.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, “Just the Facts” 5. Treatment and prevention Past, present, and future. **Schizophrenia Research**, v. 122, n. 1–3, p. 1–23, 2010.

TEJKALOVÁ, H. B.; KLASCHKA, J.; RŮŽIČKOVÁ, Š. P-1316 - Early postnatal exposure to LPS or Poly I: C changes behaviour and level of cytokines in adult rats: an animal model of schizophrenia. **European Psychiatry**, v. 27, p. 1, jan. 2012.

TERMORSHUIZEN, F. et al. Psychosis and suicide risk by ethnic origin and history of migration in the Netherlands. **Schizophrenia research**, v. 138, n. 2–3, p. 268–73, jul. 2012.

TIMARU-KAST, R. et al. Delayed inhibition of angiotensin II receptor type 1 reduces secondary brain damage and improves functional recovery after experimental brain trauma\*. **Critical care medicine**, v. 40, n. 3, p. 935–44, mar. 2012.

TOMASIK, J. et al. Neuroimmune biomarkers in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, 2014.

TOMASIK, J. et al. Neuroimmune biomarkers in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 176, n. 1, p. 3–13, 1 set. 2016.

TSOI, D. T.-Y. et al. Humour experience in schizophrenia: relationship with executive dysfunction and psychosocial impairment. **Psychological medicine**, v. 38, n. 6, p. 801–10, jun. 2008.

TURETSKY, B. I. et al. **Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: The**

**viability of selected candidate measures** *Schizophrenia Bulletin*, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN DEN BUUSE, M. et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) interacts with dopaminergic mechanisms in the brain to modulate prepulse inhibition in mice. **Neuroscience Letters**, v. 380, n. 1–2, p. 6–11, maio 2005.

VAN DEN BUUSE, M. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: pharmacology and methodology aspects. **Schizophrenia bulletin**, v. 36, n. 2, p. 246–70, mar. 2010.

VAN DER WERF, M. et al. **Systematic review and collaborative recalculation of 133 693 incident cases of schizophrenia** *Psychological Medicine* Cambridge University Press, , jan. 2014.

VASCONCELOS, G. S. et al. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. **Schizophrenia Research**, v. 165, n. 2–3, 2015a.

VASCONCELOS, G. S. et al. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. **Schizophrenia research**, v. 165, n. 2–3, p. 163–70, jul. 2015b.

VIDOVIĆ, B. et al. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress markers and antioxidative defense in patients with schizophrenia. **Psychiatria Danubina**, v. 26, n. 3, p. 205–13, out. 2014.

WALTZ, P. et al. Nitrate/Nitrite as Critical Mediators to Limit Oxidative Injury and Inflammation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 4, p. 328–339, jul. 2015.

WANG, T. et al. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1366–1373, dez. 2004.

WATKINS, C. C.; ANDREWS, S. R. Clinical studies of neuroinflammatory mechanisms in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 176, n. 1, p. 14–22, 2016.

WEICKERT, T. W. et al. Cognitive impairments in patients with schizophrenia displaying preserved and compromised intellect. **Archives of general psychiatry**, v. 57, n. 9, p. 907–13, set. 2000.

WEINBERGER, D. . From neuropathology to neurodevelopment. **The Lancet**, v. 346, n. 8974, p. 552–557, ago. 1995.

**WHO | Schizophrenia.**

WILSON, C. A.; KOENIG, J. I. Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of**

**Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 759–73, maio 2014.

WOLMARANS, D. W.; STEIN, D. J.; HARVEY, B. H. Social behavior in deer mice as a novel interactive paradigm of relevance for obsessive-compulsive disorder (OCD). **Social neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 135–149, abr. 2017.

WU, J. Q. et al. Transcriptome Sequencing Revealed Significant Alteration of Cortical Promoter Usage and Splicing in Schizophrenia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e36351, abr. 2012.

XIA, H.; LAZARTIGUES, E. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 6, p. 1482–1494, dez. 2008.

XUE, B. et al. Estrogen regulation of the brain renin-angiotensin system in protection against angiotensin II-induced sensitization of hypertension. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 307, n. 2, p. H191-8, 15 jul. 2014.

YAGI, S. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system has a pivotal role in cognitive impairment. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 36, n. 9, p. 753–758, set. 2013.

YAMADA, K. et al. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 276, n. 2, p. 460–6, fev. 1996.

YUNG, A. R. et al. Validation of “prodromal” criteria to detect individuals at ultra high risk of psychosis: 2 year follow-up. **Schizophrenia Research**, v. 105, n. 1–3, p. 10–17, out. 2008.

ZHANG, M. et al. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. **Science China. Life sciences**, v. 53, n. 1, p. 112–24, jan. 2010a.

ZHANG, M. et al. Angiotensin II induced cerebral microvascular inflammation and increased blood–brain barrier permeability via oxidative stress. **Neuroscience**, v. 171, n. 3, p. 852–858, 15 dez. 2010b.

ZHANG, T.-L. et al. The neuroprotective effect of losartan through inhibiting AT1/ASK1/MKK4/JNK3 pathway following cerebral I/R in rat hippocampal CA1 region. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 18, n. 12, p. 981–7, dez. 2012.

APÊNDICE B - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ANIMAL (CEPA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **ADENDO** ao projeto intitulado **“Ácido alfa-lipoico: uma possível estratégia de prevenção dos sintomas esquizofreniformes em animais submetidos ao modelo de esquizofrenia por desafio imune pós-natal”**, protocolo 72/15, sob responsabilidade da Prof. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, solicitando troca de substância e consequente alteração de título para **“Candesartana: uma possível estratégia de prevenção dos sintomas esquizofreniformes em animais submetidos ao modelo de esquizofrenia por desafio imune pós-natal”**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA–UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 27 de março de 2018.

Fortaleza, 02 de abril de 2018.

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador da CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

ALEXANDRE HAVT BINDÁ

COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E USO COM ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1666382

UFC